

Санкт-Петербургский государственный университет
Биологический факультет
Кафедра генетики и биотехнологии

Афанасова Дарья Вячеславовна

**Совершенствование штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*,
используемых в альфа-тесте для выявления генотоксических факторов**

Выпускная квалификационная работа бакалавра
основная образовательная программа 06.03.01 “Биология”

Работа выполнена на кафедре
генетики и биотехнологии биологического
факультета СПбГУ

Научный руководитель:
Ассистент каф. генетики и биотехнологии СПбГУ,
к.б.н., Степченкова Елена Игоревна

Санкт-Петербург
2019

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	3
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1. Генетические основы альфа-теста	6
1.1 Жизненный цикл дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i> и генетический контроль типа спаривания.....	6
1.2 Альфа-тест и генетические события, учитываемые с его использованием.....	10
1.3 Штаммы дрожжей, используемые в альфа-тесте, и возможные направления их совершенствования.....	14
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	19
1. Штаммы дрожжей <i>S. cerevisiae</i>	19
2. Плазмиды.....	20
3. Среда и условия культивирования.....	21
4. Трансформация	22
4.1 Трансформация дрожжей <i>S. cerevisiae</i>	22
4.2 Трансформация бактерий <i>E. coli</i>	22
5. Молекулярно-генетические методы	23
6. Методы частной генетики дрожжей	24
7. Альфа-тест.....	24
8. Качественное определение частоты возникновения «незаконных» гибридов.....	25
9. Статистические методы	25
РЕЗУЛЬТАТЫ	26
1. Модификация тестерного штамма, используемого в альфа-тесте, путём внесения мутации <i>mata2</i> и проверка эффективности этой модификации в тесте на «незаконную» гибридизацию	26
2. Генетическая модификация дрожжевого штамма, используемого в альфа-тесте в качестве партнёра для скрещивания и проверка его эффективности	28
2.1 Получение штамма G-10B-OM5, несущего промотор <i>pGAL1</i> в центромере хромосомы III и проверка эффективности этой модификации	29
2.2 Конструирование штамма GM-10B-OM5, несущего дополнительную копию локуса <i>MATa</i> в левом плече и промотор <i>pGAL1</i> в центромере хромосомы III и проверка эффективности его использования в альфа-тесте	30
ОБСУЖДЕНИЕ.....	36
ВЫВОДЫ	40
БЛАГОДАРНОСТИ	41
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	42

ВВЕДЕНИЕ

Впервые химический мутагенез был описан в 40-е годы прошлого столетия в работах И. А. Рапопорта и Ш. Ауэрбах, независимо обнаруживших влияние некоторых веществ на частоту мутаций у дрозофилы. С тех пор был выявлен широкий спектр химических и физических агентов, способных повреждать генетический материал живых организмов. Агенты, потенциально способные влиять на стабильность генома, могут входить в состав фармацевтических препаратов, бытовой химии, косметических продуктов, пестицидов и инсектицидов, отходов промышленного производства, токсинов бактерий и грибов. К примеру, бутилпарабен и бисфенол А, обнаруженные в косметических продуктах, фармацевтике и пищевых продуктах, исследователи связывают с повреждениями ДНК в сперматозоидах (Oishi, 2002; Meeker et al., 2010). Мутагенным действием обладают также физические воздействия, например, ультрафиолетовое и ионизирующее излучения. Мутагенные факторы индуцируют повреждения ДНК, которые являются субстратом систем репарации. Абсолютное большинство повреждений ДНК эффективно устраняется системами репарации с полным восстановлением структуры и последовательности ДНК. Однако в результате ошибок систем репарации небольшая часть первичных повреждений может превращаться в наследуемые генные мутации или хромосомные перестройки, что приводит к негативным последствиям, таким как наследственные и онкологические заболевания, а также снижение жизнеспособности и ускорение процессов старения (Nasheuer, 2010). Несмотря на высокую эффективность репарации, достаточно большое количество повреждений ДНК может сохраняться до момента или возникать во время репликации ДНК, особенно на фоне воздействия сильных мутагенов, вызывающих серьезные нарушения структуры ДНК, такие как крупные аддукты и разрывы молекулы ДНК. При репликации поврежденной ДНК также с высокой частотой возникают генные, хромосомные и геномные мутации.

К 1960-м годам были накоплены обширные данные о потенциальной опасности некоторых мутагенов для человека. В связи с этим возникло новое направление исследований на стыке генетики, токсикологии и биохимии – генетическая токсикология, основной целью которого стала оценка способности химических веществ и физических факторов индуцировать мутации в клетках человека. В генетической токсикологии существуют две проблемы: во-первых, нет способа, позволяющего напрямую оценить мутагенную и канцерогенную опасность генотоксических факторов для человека, без вреда для самого человека, во-вторых, при массовых скринингах необходимо тестировать большой объем потенциально опасных мутагенов, что существенно повышает стоимость

тестирования на модели млекопитающих. Поэтому для проведения массовых тестов используют тест-системы, позволяющие выявлять определенные нарушения генетического материала на простых моделях. Создание универсальной тест-системы все еще не представляется возможным, поэтому были разработаны батареи тестов, состоящие из нескольких ГОСТИрованных тест-систем, которые дополняют друг друга и в разной степени решают указанные проблемы генетической токсикологии. Проверку различных веществ на наличие мутагенной активности проводят в несколько этапов (de Serres et al., 1980). На первом этапе с целью выявления потенциальных мутагенов, чаще всего используют тест Эймса, позволяющий выявлять реверсии у бактерий *Salmonella typhimurium*. Реже используют тесты на учет рецессивных сцепленных с полом летальных мутаций или соматического мозаицизма у плодовой мушки *Drosophila melanogaster*, микроядерный тест полихроматофильных эритроцитов костного мозга грызунов. Тесты, используемые на начальном этапе, являются краткосрочными и наименее трудоемкими, что позволяет проводить быстрый скрининг большого количества факторов на наличие у них мутагенных свойств. Однако надежность результатов зависит от филогенетической близости тестера к человеку, поэтому вещества, показавшие мутагенную активность на первом этапе, рекомендуют ко второму и, при необходимости, третьему этапам тестирования. На заключительных этапах тестирования в основном используют методы учета мутаций в соматических и половых клетках млекопитающих и человека, таких как учет доминантных леталей в зародышевых клетках мышей, метод специфических локусов и транслокационный тест у мышей (Абилев и Глазер, 2015). После второго этапа мутагены либо однозначно запрещаются к использованию, либо, при незаменимости или особой значимости, проходят проверку на способность индуцировать мутации в половых клетках млекопитающих. Тесты на данных этапах являются дорогостоящими и длительными: метод изучения канцерогенной активности одного вещества на грызунах требует около двух лет работы и около 800 мышей и крыс на исследование одного вещества (Абилев и Глазер, 2015).

Уникальное положение среди известных тест-систем занимает пока не ГОСТИрованный альфа-тест, разработанный сотрудниками кафедры генетики и биотехнологии Санкт-Петербургского государственного университета. Его отличительной особенностью является способность выявлять фенотипическое проявление первичных повреждений до их исправления системами репарации ДНК и фиксации в форме генных или хромосомных мутаций, а также способность различать первичные повреждения и наследуемые изменения генетического материала (Репневская и др., 1989). Благодаря этим особенностям и широкому спектру регистрируемых нарушений использование альфа-теста

может быть весьма перспективно для первичного скрининга мутагенных факторов. Также возможность выявлять разные по своей природе изменения ДНК может быть использована для изучения синергизма мутагенных эффектов.

К настоящему моменту проведён целый ряд научно-исследовательских работ, подтверждающих эффективность использования альфа-теста, а также опубликованы результаты исследований, в которых альфа-тест был использован в качестве главного метода для изучения процессов мутагенеза. (Inge-Vechtomov, 1985; Инге-Вечтомов и др., 1989; Репневская, 1989; Lemoine et al., 2005; Коченова и др., 2008; Kochenova et al, 2011; Андрейчук, 2012; Жук, 2016; Novoa et al., 2018). В ходе этих исследований были получены результаты, позволившие наметить направления для дальнейшего совершенствования и упрощения альфа-теста, что, безусловно, важно для ускорения внедрения метода в практику и повышения эффективности альфа-теста. На основе анализа имеющихся экспериментальных данных мы сформулировали ряд предложений по модификации штаммов дрожжей, которые, как мы ожидаем, приведут к усовершенствованию альфа-теста. Таким образом, целью данной работы является совершенствование альфа-теста, направленное на упрощение процедуры тестирования и повышение чувствительности тест-системы. Для ее достижения были поставлены следующие задачи:

1. Модифицировать тестерный штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* путём внесения мутации *mata2*.
2. Модифицировать штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, используемый в альфа-тесте для регистрации переключения типа спаривания у тестерного штамма, путем внесения следующих модификаций III хромосомы: инсерция промотора *pGAL1* в центромеру и инсерция дополнительной копии локуса *MAT α* в левое плечо хромосомы III.
3. Разработать методику проведения альфа-теста с использованием полученных штаммов.
4. Оценить эффективность полученных штаммов для создания обновленной тест-системы.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. Генетические основы альфа-теста

1.1 Жизненный цикл дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и генетический контроль типа спаривания

Альфа-тест основан на системе генетического контроля типа спаривания дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. *S. cerevisiae* – это почкующиеся дрожжи, жизненный цикл которых состоит из гаплоидной и диплоидной фаз (Рис.1). Гаплоидные дрожжевые клетки могут иметь один из двух типов спаривания – α или a . Клетки противоположных типов спаривания могут скрещиваться, образуя диплоидные гибриды α/a . В диплоидном состоянии дрожжи приобретают способность вступать в мейоз с образованием тетрады гаплоидных спор.

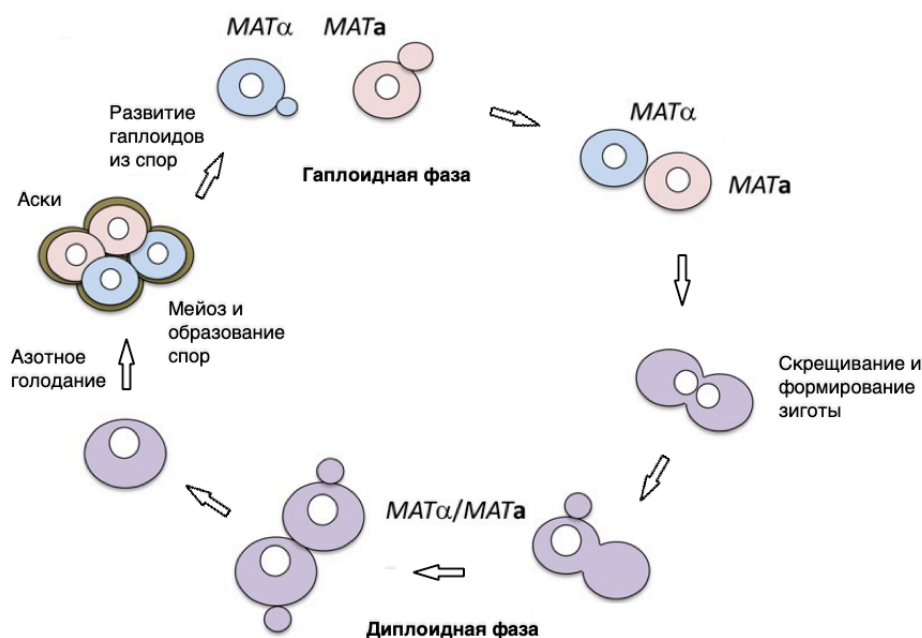


Рисунок 1. Жизненный цикл гетероталлического штамма *Saccharomyces cerevisiae* (по Haber, 2012 с изменениями).

Клетки разного типа секретируют соответствующие феромоны (α или a), с помощью которых они находят партнеров для спаривания (Bardwell, 2005). Информация о типе спаривания дрожжевой клетки закодирована в локусе *MAT*, несущем альтернативные последовательности – $MATa$ или $MAT\alpha$. Такие последовательности имеют существенные отличия и разное происхождение, поэтому их называют идиоморфами локуса *MAT*, в отличие от аллелей, которые обычно имеют большее сходство (Herskowitz, 1989). Главное отличие $MATa$ и $MAT\alpha$ состоит в последовательностях длиной 700 п. н., названных $Y\alpha$ и Ya соответственно. Идиоморф $MATa$ имеет две группы комплементации – $MATa1$ и $MATa2$, регулируемые общим двусторонним промотором (Рис. 2) (Siliciano and Tatchell, 1984). В

локусе *MATa* имеются две открытые рамки считывания – *MATa1* и *MATa2*. Гены, содержащиеся в локусе *MAT*, кодируют транскрипционные факторы, которые регулируют специфичный для каждого типа спаривания набор генов, в том числе гены биосинтеза феромонов и рецепторов к ним. В клетках типа α *MATa1* совместно с конститутивно экспрессируемым белком Mcm1 активирует только *asg* (α -specific genes) (Kassir and Simchen, 1976; Hagen et al., 1993; Bruhn and Sprague, 1994). *MATa2* совместно с Mcm1 репрессирует *asg* (α -specific genes), экспрессия которых происходит конститутивно. При одновременной экспрессии *MATa* и *MATa*, продукты генов *MATa2* и *MATa1* репрессируют гаплоид-специфичные гены (*hsg*) и индуцируют экспрессию диплоид-специфичных генов, обеспечивающих споруляцию (Рис. 3), а клетки приобретают фенотип n/m. Функция гена *MATa2* все еще остается неизвестной. Поскольку экспрессия *asg* генов не требует активаторов, при нарушении экспрессии *MATa* в результате мутации или повреждения ДНК обоих генов *MATa1* и *MATa2*, клетка, исходно имеющая тип спаривания α , переключает его на противоположный (Рис. 4, В и Г). Такие мутанты имеют Alf -фенотип, или рецессивный α , и способны скрещиваться с клетками α типа спаривания, гибриды от такого скрещивания имеют тип спаривания α . При появлении мутаций в одном из двух генов *MATa1* и *MATa2*, клетки дрожжей теряют способность к спариванию и приобретают фенотип, условно обозначаемый n/m (non mating). При инактивации гена *MATa2* одновременно экспрессируются как *asg*, так и *asg*, что ведет к фенотипу n/m (Рис. 4, Б). Стерильность n/m при инактивации *MATa1* возникает из-за отсутствия продуктов *asg* и *asg*, поскольку этот ген стимулирует экспрессию *asg* (Рис. 4, А).



Рисунок 2. Схема строения третьей хромосомы дрожжей *S. cerevisiae*.

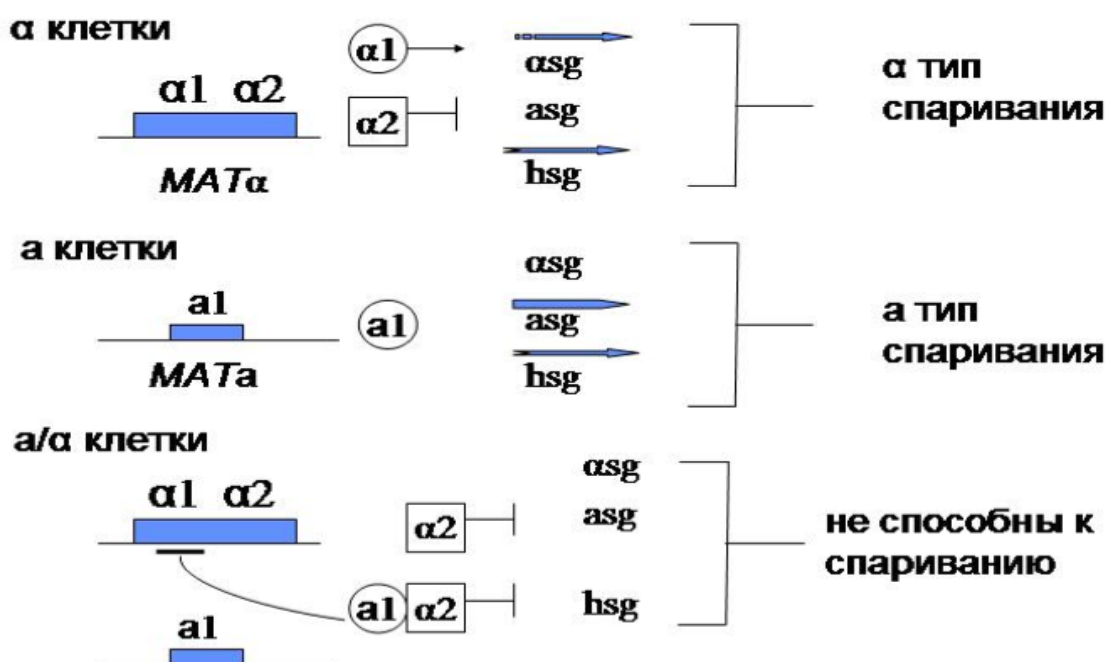


Рисунок 3. Генетический контроль типа спаривания дрожжей *S. cerevisiae* (Stathern et al, 1981).

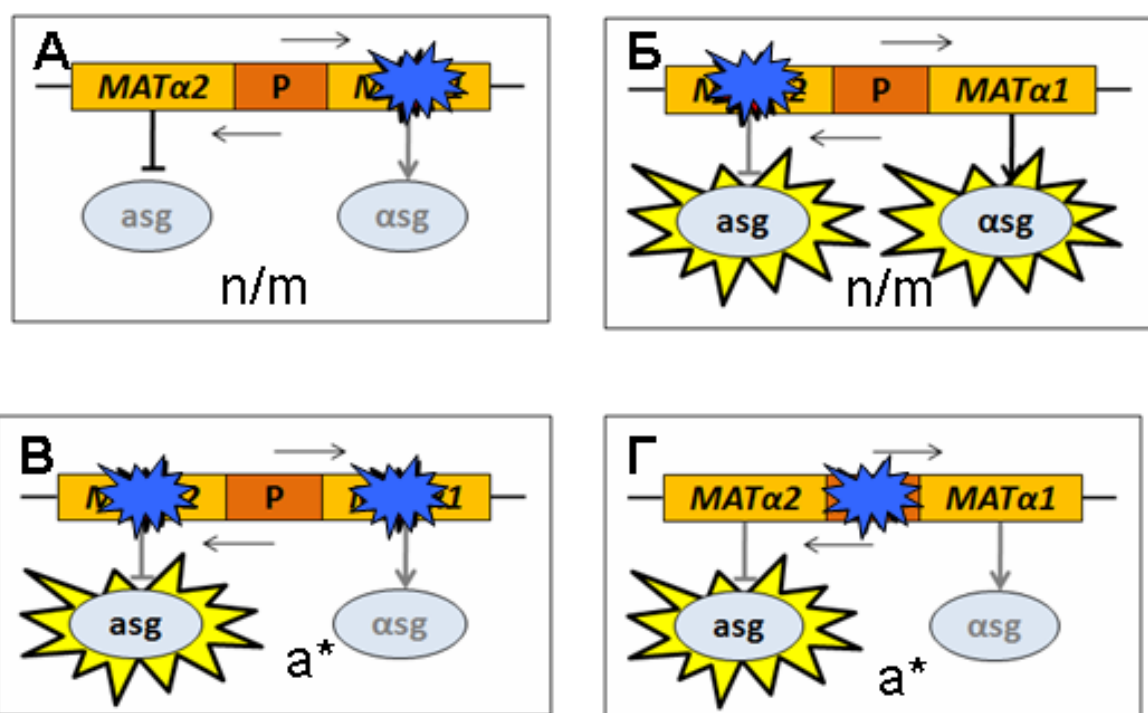


Рисунок 4. Фенотипическое проявление повреждений локуса *MATα*: (А) повреждение или мутация в *MATα1* приводит к стерильности; (Б) повреждение или мутация в *MATα2* приводит к стерильности; (В) повреждение или мутация в одновременно *MATα1* и *MATα2* проявляется как *Alf*-фенотип или рецессивный *a* (*a**); (Г) повреждение или мутация в двустороннем промоторе *MATα* проявляется как *Alf*-фенотип или стерильный *a* (*a**) (Андрейчук, 2012).

Помимо локуса *MAT* в третьей хромосоме имеются еще два локуса *HML α* и *HMR α* , необходимые для переключения типа спаривания у гомоталличных дрожжей (Рис. 2). В кассете *HML α* находятся гены *MAT α 1* и *MAT α 2*, а в *HMR α* – *MAT α 1* и *MAT α 2* (Nasmyth and Tachel, 1980). Экспрессия кассет *HML α* и *HMR α* репрессирована посредством сложного взаимодействия четырех сайленсеров с транс-действующими белками, в совокупности формирующих короткие области гетерохроматина. Последовательность, содержащаяся в молчащих кассетах, способна замещать последовательность в локусе *MAT* (Рис. 5), что может приводить к переключению типа спаривания (Abraham et al., 1984; Feldman et al., 1984). У гомоталличных штаммов дрожжей смена типа спаривания может происходить каждое клеточное деление благодаря эндонуклеазе HO. Она производит двунитевой разрыв в коротком сайте узнавания, чем инициирует конверсию, которая приводит к замене последовательности в локусе *MAT* на последовательность одной из кассет (Strathern et al., 1982; Kostriken et al., 1983). У гетероталличных штаммов дрожжей инактивирован ген эндонуклеазы *HO*, поэтому переключение типа спаривания по кассетному механизму у таких штаммов практически не происходит и тип спаривания стабильно наследуется. В редких случаях при возникновении случайных разрывов или, возможно, других повреждений может происходить конверсия или рекомбинация между молчащими кассетами и локусом *MAT*.

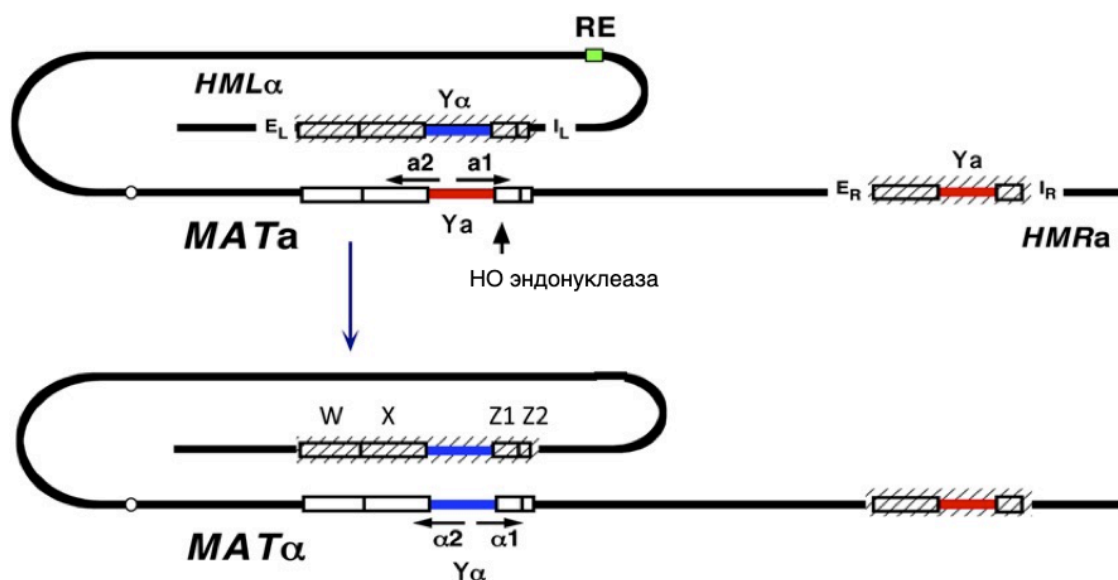


Рисунок 5. Схема переключения типа спаривания *MAT α* на *MAT α* (Haber, 2012). Штрихами обозначены области гетерохроматина молчащих кассет *HML α* и *HMR α* .

1.2 Альфа-тест и генетические события, учитываемые с его использованием

Перечисленные выше особенности контроля типа спаривания у дрожжей были использованы при разработке альфа-теста для регистрации и оценки частоты первичных повреждений и наследуемых изменений генетического материала, возникающих в локусе *MATa*, как спонтанно, так и при действии экзогенных факторов. В альфа-тесте показателем генетической активности исследуемого фактора является повышение частоты переключения типа спаривания $\alpha \rightarrow a$ на фоне воздействия этого фактора по сравнению со спонтанной частотой. В альфа-тесте факт переключения типа спаривания $\alpha \rightarrow a$ фиксируют по образованию «незаконных» гибридов при скрещивании двух штаммов одинакового типа спаривания α в селективных условиях.

Альфа-тест состоит из двух взаимодополняющих систем – системы «незаконной» гибридизации и «незаконной» цитодукции (Рис. 6). Каждая из этих систем позволяет выявлять только часть генетических событий, которые приводят к изменению типа спаривания и «незаконному» скрещиванию клеток. В системе «незаконной» гибридизации гаплоидные клетки дрожжей, исходно имеющие одинаковый тип спаривания α , копулируют и образуют диплоидные «незаконные» гибриды. При этом один из штаммов является тестерным и обрабатывается мутагеном, а второй – партнером для скрещивания, не подвергающимся мутагенному воздействию. «Незаконная» гибридизация возможна, если одна из клеток поменяла тип спаривания $\alpha \rightarrow a$ в результате каких-либо нарушений экспрессии *MATa* (первичные повреждения и мутации в различных участках локуса *MAT*, рекомбинационные события, потеря плеча или целой III хромосомы). Определить частоту образования таких «незаконных» гибридов можно используя селективные среды. Анализируя фенотип «незаконных» гибридов можно определить тип нарушений, приведших к переключению типа спаривания и как следствие возникновению «незаконного» гибрида. В системе «незаконной» гибридизации возможно выявить потери правого плеча хромосомы III, потери целой хромосомы III, реципрокную рекомбинацию между кассетой *HMRa* и локусом *MATa* и конверсию последовательности *HMRa* в локус *MATa* (Табл.1). Потеря III хромосомы или ее правого плеча приводит к потере прототрофности по маркерам либо всей III хромосомы, либо ее правого плеча у «незаконных» гибридов (Рис. 7, В и Г). Для маркирования левого плеча хромосомы III удобно использовать мутацию *thr4*, а правого – *his4*. Реципрокная рекомбинация между *MATa* и кассетой *HMRa* и конверсия *HMRa* в локус *MATa* приводят к замене локуса *MATa* на *MATa* и к фенотипу n/m у возникшего «незаконного» гибрида. При реципрокной рекомбинации происходит образование ацентрического фрагмента хромосомы III, что

ведет к потере прототрофности по маркерам, попадающим в данный фрагмент (Рис 7, А и Б). Также в системе «незаконной» гибридизации можно выявить мутации в одном из генов, мутации одновременно в двух генах или в общем двустороннем промоторе, делеции и временные повреждения в локусе *MATα*, однако данные события находятся в едином фенотипическом классе, который характеризуется прототрофностью по всем маркерам хромосомы III и α-типом спаривания возникающих «незаконных» гибридов. Различить их между собой возможно в системе «незаконной» цитодукции.

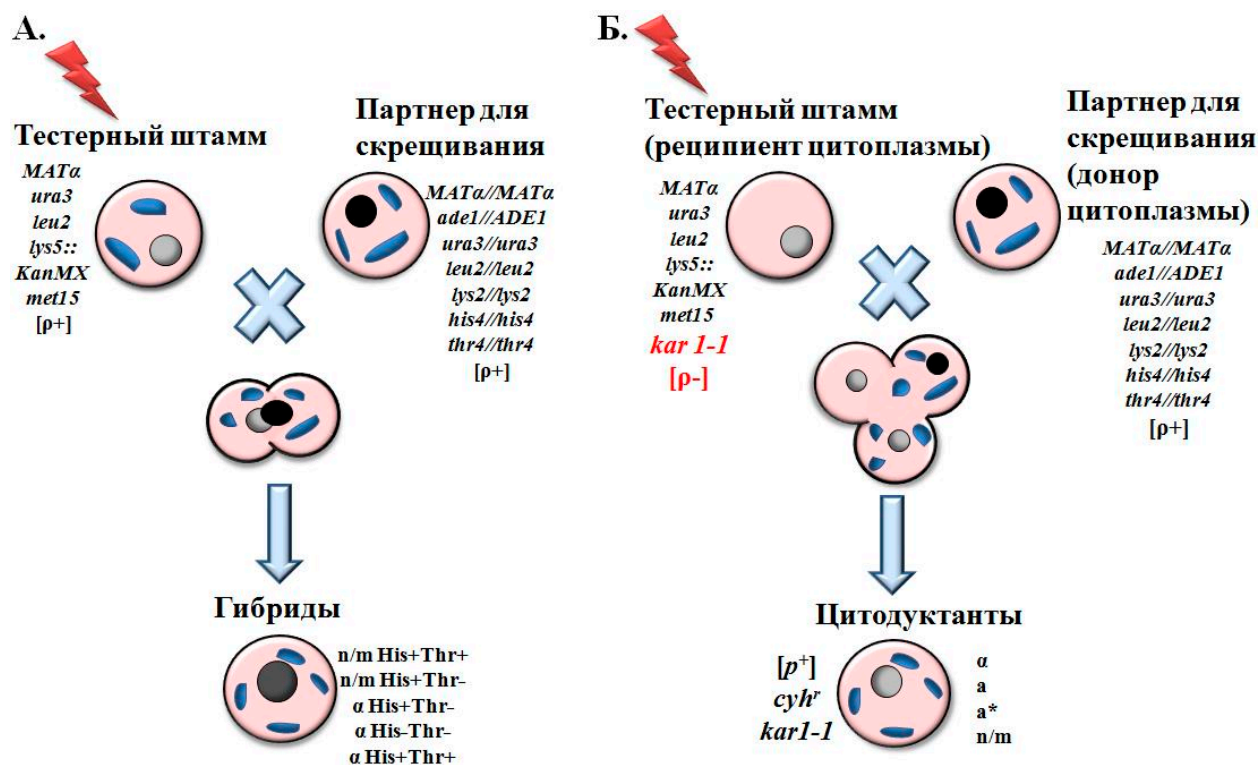
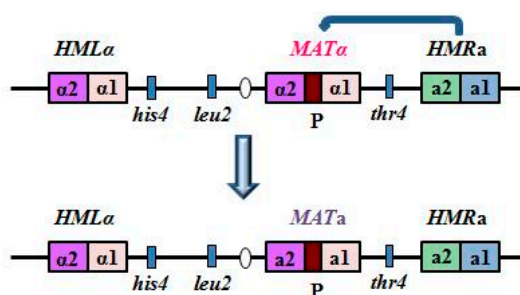


Рисунок 6. Общая схема альфа-теста: А – «незаконная» гибридизация, Б – «незаконная» цитодукция (Жук, 2016).

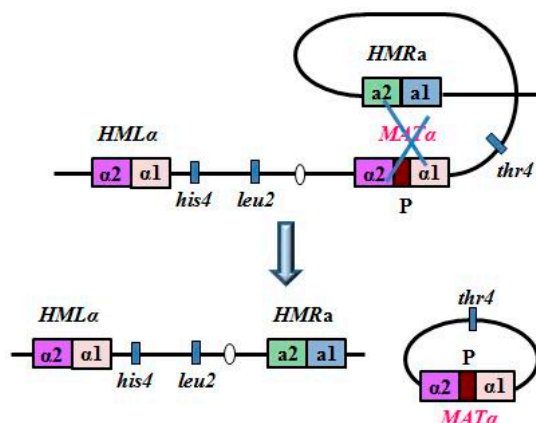
Таблица 1. Генетические события и фенотип соответствующих им «незаконных» гибридов и цитодуктантов, выявляемых в альфа-тесте при скрещивании двух штаммов *MAT α HIS4 THR4* \times *MAT α his4 thr4*.

Генетическое событие	Фенотип «незаконного» гибрида	Фенотип «незаконного» цитодуктанта
Конверсия кассеты <i>HMRα</i> в локус <i>MATα</i>	n/m His ⁺ Thr ⁺	a
Реципрокная рекомбинация между локусом <i>MATα</i> и кассетой <i>HMRα</i>	n/m His ⁺ Thr ⁻	леталь
Потеря правого плеча хромосомы III	α His ⁺ Thr ⁻	
Потеря хромосомы III	α His ⁻ Thr ⁻	
Мутация в локусе <i>MATα</i> (в <i>MATα1</i> или <i>MATα2</i>)	α His ⁺ Thr ⁺	n/m
Мутации в <i>MATα</i> (одновременно в <i>MATα1</i> и <i>MATα2</i> или в двустороннем промоторе, делеции <i>MATα</i>)		a*
Временные (первичные) повреждения в локусе <i>MATα</i> (одновременно в <i>MATα1</i> и <i>MATα2</i> , или в двустороннем промоторе), устраняемые репарацией безошибочно после скрещивания		α

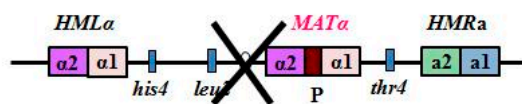
А. Конверсия между локусом *MATa* и касетой *HMRa*



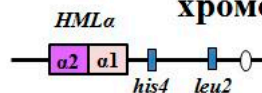
Б. Рекомбинация между локусом *MATa* и касетой *HMRa*



В. Потеря хромосомы III



Г. Потеря правого плеча хромосомы III



Д. Мутации или временные повреждения в локусе *MATa*

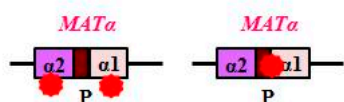


Рисунок 7. Нарушения генетического материала, выявляемые в альфа-тесте (Жук 2016). А) конверсия касеты *HMRa* в локус *MATa*; Б) рекомбинация между *HMRa* и *MATa*; В) потеря хромосомы III; Г) потеря правого плеча хромосомы III вместе с *MATa*; Д) временные повреждения или генные мутации, произошедшие одновременно в обоих генах локуса *MATa* или в двустороннем промоторе.

Система «незаконной» цитодукции позволяет отбирать «незаконных» цитодуктантов – гаплоидные клетки, несущие ядро одного из родительских штаммов и смешанную цитоплазму обоих родителей. Так, при проведении альфа-теста в системе «незаконной» цитодукции, нарушение экспрессии генов локуса *MATa* приводит к временному или наследуемому переключению типа спаривания и последующей копуляции с клеткой α , как и при «незаконной» гибридизации, однако слияния ядер не происходит. На первом этапе цитодукции образуется многоядерная зигота, которая затем может дать начало гетерокарионам. В дальнейшем гетерокарионы могут дать начало цитодуктантам. Так как в норме подобные события происходят очень редко (менее 1% от всех зигот), то для повышения частоты «незаконной» цитодукции используют различные мутации, препятствующие кариогамии, в частности, мутацию *kar1-1* (Conde and Fink, 1976; Zakharov

and Yarovoy, 1977; Жук и др., 2018). При использовании таких мутантов, частота возникновения цитодуктантов повышается до 95% от общего числа зигот. В системе «незаконной» цитодукции используют два штамма, один из которых является донором цитоплазмы с функционирующими митохондриями, а второй реципиентом с дыхательной некомпетентностью, последний обрабатывают мутагенами. После скрещивания дыхательная некомпетентность штамма-реципиента компенсируется за счет митохондрий штамма-донора цитоплазмы. Именно с помощью системы «незаконной» цитодукции возможно клонировать гаплоидное ядро штамма-реципиента цитоплазмы. Благодаря этому появляется возможность исследовать гаплоидное ядро клетки, подвергшейся генотоксическому воздействию, и определить событие, которое привело к переключению типа спаривания и копуляции клеток: первичное повреждение или мутационное изменение генетического материала (Табл. 1).

Каждый из вариантов альфа-теста обладает своими преимуществами и недостатками. Для получения наиболее полных результатов при тестировании различных факторов целесообразно использовать обе системы параллельно.

1.3 Штаммы дрожжей, используемые в альфа-тесте, и возможные направления их совершенствования

В альфа-тесте используют два штамма, один из которых обрабатывают мутагенами, а второй служит партнером для скрещивания и необходим для фиксации событий переключения типа спаривания $\alpha \rightarrow a$ у тестерного штамма. Штаммы, используемые в альфа-тесте, должны отвечать ряду требований (Степченкова и др., 2009):

1. Штаммы дрожжей должны иметь одинаковый тип спаривания (α) и нести комплементарные стабильные генетические маркеры для отбора редких гибридов и цитодуктантов.
2. В качестве партнера для скрещивания целесообразно использовать автодиплоидный штамм, гомозиготный по локусу *MAT α* . Ранее было показано, что внесение дополнительной копии *MAT α* в клетку дрожжей на дополнительной хромосоме или плазмиде существенно снижает частоту «незаконной» гибридизации (Репневская, 1989; Андрейчук, 2012). Поэтому автодиплоидность штамма партнера для скрещивания снижает влияние спонтанных и индуцированных мутаций в локусе *MAT α* этого штамма на результаты альфа-теста.
3. Тестерные штаммы должны иметь стабильные маркеры в обоих плечах хромосомы III. Это позволит детектировать крупные генетические изменения – хромосомные aberrации и потери.

4. Гаплоидный штамм (тестерный) должен нести маркеры, позволяющие отбирать цитодуктантов.
5. В одном из штаммов в системе «незаконной» цитодукции необходимо наличие мутации, нарушающей кариогамию, например *kar1-1*.
6. Мутация *kar1-1* стимулирует цитодукцию, однако она приводит к снижению частоты гибридизации, поэтому в тестах на «незаконные» гибридизацию и цитодукцию используют различные тестерные штаммы *KAR1* и *kar1-1*, соответственно.

На основе данных критериев и имеющихся исследований, проведенных с использованием альфа-теста, мы предлагаем использовать ряд модификаций, которые могут способствовать совершенствованию тест-системы. Ранее в нашей лаборатории было показано, что использование в альфа-тесте штаммов, несущих мутацию в одном из генов *MATa1* или *MATa2*, существенно увеличивает частоту «незаконной» цитодукции (Андрейчук, 2012), влияние этих мутаций на частоту «незаконной» гибридизации в этой работе не изучали. Мы полагаем, что наличие одной мутации *mata1* или *mata2* (Рис. 8, а) существенно могло бы повысить чувствительность тест-системы, поскольку в отличие от переключения типа спаривания $\alpha \rightarrow a$ переключение $n/m \rightarrow a$ должно происходить чаще, поскольку в этом случае для приобретения типа спаривания *a* необходимо появление одной мутации или повреждения, а при скрещивании $\alpha \times \alpha$ переключение $\alpha \rightarrow a$ требует двух событий. Мы предлагаем использовать данный подход и внести мутацию *mata2* в хромосому III тестерного штамма.

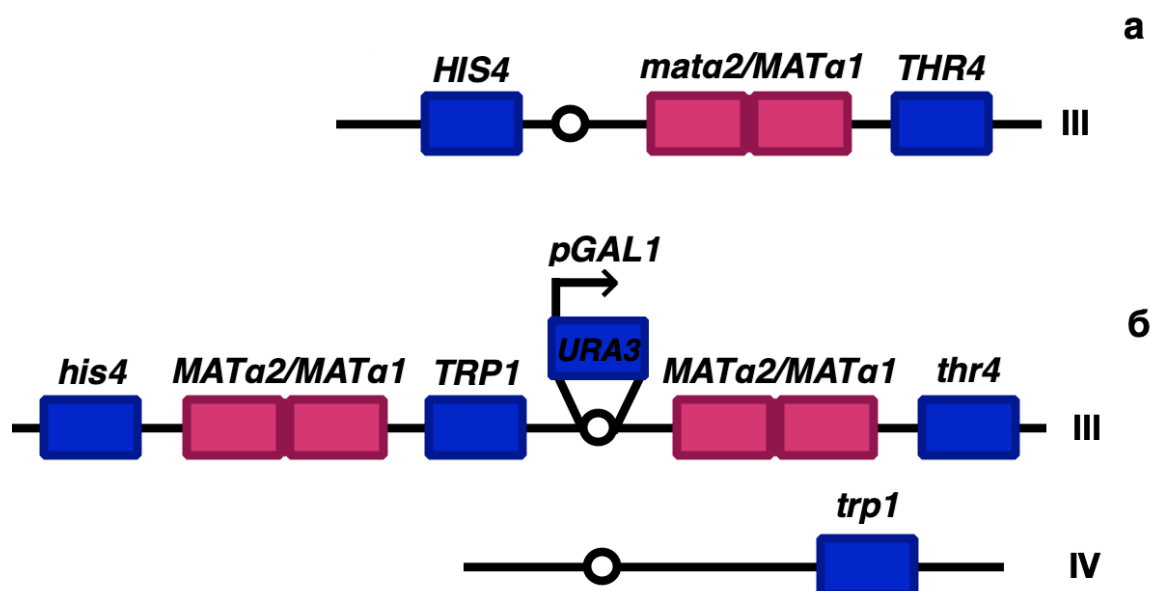


Рисунок 8. Схема третьей хромосомы и планируемые изменения в ней у тестерного штамма K5-35B-Д924 (а) и штамма партнера для скрещивания 10B-ОМ5 (б).

Другое усовершенствование может состоять в уходе от использования различных штаммов в системах «незаконной» гибридизации и «незаконной» цитодукции и объединении этих тестов в рамках одной процедуры. Это может быть решено путем генетической модификации III хромосомы штамма-партнера для скрещивания, позволяющей с высокой эффективностью индуцировать потерю указанной хромосомы после возникновения «незаконного» гибрида. Для осуществления этой идеи можно реализовать подход, впервые описанный в работе Рейда с соавторами (Reid et al., 2008) и использованный А. Жук (Жук, 2016). В этих работах было показано, что при активной транскрипции в районе центромеры с высокой частотой происходит потеря соответствующей хромосомы за счет нарушения прикрепления веретена деления к кинетохору. Для индукции транскрипции в центромерные районы встраивали регулируемый галактозный промотор *pGAL1*. При использовании указанной конструкции на среде с галактозой потеря III хромосомы происходит с частотой, существенно превышающей частоту потери той же хромосомы на среде с глюкозой (Reid 2008; Жук, 2016). Мы предполагаем, что внесение промотора *pGAL1* в центромеру тестерного штамма позволит объединить возможности тестов на «незаконную» гибридизацию и цитодукцию в единую систему. Для этого штамм с *pGAL1*, встроенным в центромеру III хромосомы, будет использован в тесте на «незаконную» гибридизацию в качестве штамма-партнера для скрещивания. Затем отобранные «незаконные» гибриды будут проверены на селективных средах и на тестерах типа спаривания для выявления крупных хромосомных нарушений (Табл. 1). Далее те же «незаконные» гибриды будут помещены на среду с галактозой для индукции потери III хромосомы штамма-партнера для скрещивания. После пассирования «незаконных» гибридов на среде с галактозой гибриды будут нести единственную III хромосому, полученную от тестерного штамма, подвергавшегося обработке изучаемым мутагеном (Рис. 9). Возможным препятствием для реализации такой схемы эксперимента может стать то, что в альфа-тесте в качестве штамма-партнера для скрещивания часто используют диплоидный штамм, гомозиготный по *MATa*. Это обусловлено необходимостью снижения влияния генетических нарушений, возникающих в геноме штамма-партнера для скрещивания, на результаты альфа-теста.

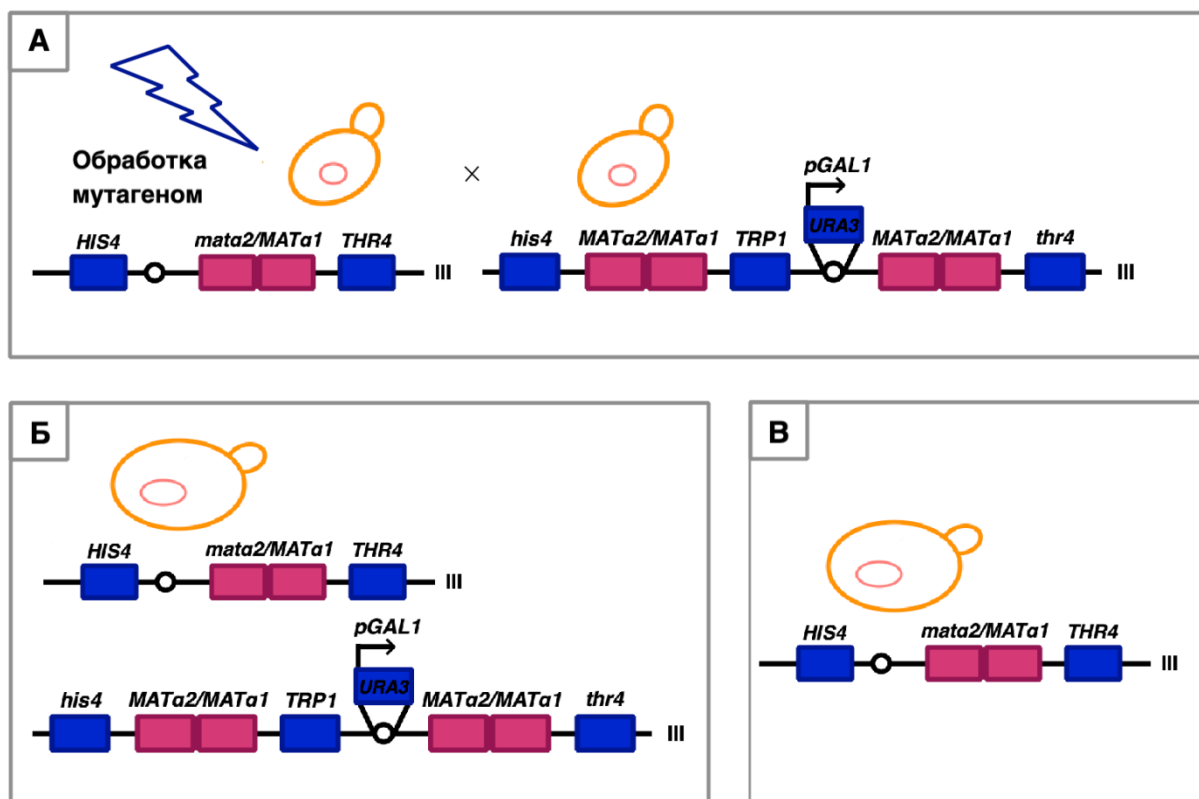


Рисунок 9. Общая схема обновленной методики проведения альфа-теста. (А) Гибридизация тестерного штамма, обработанного мутагеном, со штаммом-партнером для скрещивания. Образуются диплоидные гибриды (Б), у которых на среде с галактозой происходит элиминация хромосомы III штамма-партнера для скрещивания (В).

Использование автодиплоидного штамма, имеющего две хромосомы III с галактозным промотором в центромерной области – нежелательно, поскольку по нашим предварительным данным это может снизить эффективность потери одновременно двух хромосом. Для решения данной проблемы можно использовать следующий подход: гаплоидный штамм-партнер для скрещивания будет нести два локуса *MATa* в единственной хромосоме III. В данном случае, при спонтанной мутации или повреждении одного из двух локусов *MATa*, дополнительный локус обеспечит экспрессию *asg*, а соответствующий штамм сохранит тип спаривания α . Таким образом, для объединения тестов на «незаконную» цитодукцию и гибридизацию мы предлагаем модифицировать III хромосому штамма-партнера для скрещивания по следующей схеме: а) внести дополнительную копию *MATa* в левое плечо хромосомы III; б) внести в центромеру хромосомы III конструкцию с *pGAL1* для эффективной индукции потери III хромосомы после образования «незаконного» гибрида (Рис. 8, б).

Таким образом, целью данной работы является совершенствование тест-системы альфа-тест, направленное на упрощение процедуры тестирования и повышение

чувствительности тест-системы. Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Модифицировать тестерный штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* путём внесения мутации *mata2*.
2. Модифицировать штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, используемый в альфа-тесте для регистрации переключения типа спаривания у тестерного штамма, путем внесения следующих модификаций III хромосомы: инсерция промотера *pGAL1* в центромеру и инсерция дополнительной копии локуса *MAT α* в левое плечо хромосомы III.
3. Разработать методику проведения альфа-теста с использованием полученных штаммов.
4. Оценить эффективность полученных штаммов для создания обновленной тест-системы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Штаммы дрожжей *S. cerevisiae*

В работе использовали дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Генотипы использованных штаммов представлены в таблице 2.

Таблица 2. Штаммы, использованные в работе.

Название штамма	Генотип	Источник
10B-OM5	<i>MATa ade1Δ ura3Δ leu2Δ lys2Δ his4Δ thr4Δ</i>	(Степченкова и др., 2009)
K5-35B-Д924	<i>MATa ura3Δ leu2Δ lys5::KanMX met15Δ</i>	
Д926	<i>MATa // MATa leu2 Δ // leu2 Δ lys2 Δ // lys2 Δ ura3 Δ // ura3 Δ his4 Δ // his4 Δ thr4 Δ // thr4 Δ</i>	
LAN201-Ura3 Δ	<i>MATa ura3-Δ_ade5-1 lys2-Tn5-13 trp1-289 his7-2 leu2-3,112</i>	(Stepchenkova et al., 2017)
A-K5-35B-Д924	<i>MATa1 mata2 ura3Δ leu2Δ lys5::kanMX met15Δ</i>	Получены в данной работе
G-10B-OM5	<i>MATa ade1Δ URA3Δ leu2Δ lys2Δ his4Δ thr4Δ CEN3::pGal1-CEN3-URA3</i>	
M-10B-OM5	<i>MATa/MATa ade1Δ ura3Δ leu2Δ lys2Δ his4Δ thr4Δ</i>	
GM-10B-OM5	<i>MATa/MATa ade1Δ URA3Δ leu2Δ lys2Δ his4Δ thr4Δ CEN3::pGal1-CEN3-URA3</i>	
10B-OM5-trp1	<i>MATa ade1Δ ura3Δ leu2Δ lys2Δ his4Δ thr4Δ trp1-2Δ</i>	
78A-П2345	<i>MATa his5</i>	Петергофская генетическая коллекция
2Г-П2345	<i>MATa his5</i>	

2. Плазмиды

В работе были использованы плазмиды: pRS306-mat α 2-STOP, pCEN-UG, pRS306-MAT α , pRS306-trp1-2 Δ , UIRL-Ytel11/1, UIRL-MAT.

1. Плазмида pRS306-mat α 2-STOP использовалась для внесения преждевременного STOP-кодона в ген *MAT α 2* штамма K5-35B-Д924 методом двухшагового замещения. Указанная плазмида была получена ранее в нашей лаборатории на основе интегративного вектора pRS306.
2. Плазмида pCEN-UG была использована для встраивания индуцируемого промотора гена *pGAL1* в центромеру хромосомы III (CEN3::pGal1-CEN3-URA3) штаммов 10B-OM5 и M-10B-OM5. Плазмида pCEN-UG была любезно предоставлена профессором Робертом Рейдом (Медицинский центр Колумбийского университета, США) (Reid et al., 2008).
3. Плазмида pRS306-trp1-2 Δ была получена ранее в нашей лаборатории и использовалась для внесения делеции двух нуклеотидов GC (в положениях 73 и 74) в ген *TRP1* штамма-партнера для скрещивания.
4. Плазмида UIRL-MAT была сконструирована в данной работе на основе плазмид UIRL-Ytel11/1 и pRS306-MAT α . Плазмида UIRL-Ytel11/1 была любезно предоставлена Аксеновой Анной Юрьевной (СПбГУ) (Aksenova et al., 2013).

Плазмиды перед трансформацией были гидролизованы с помощью ферментов рестрикции: pRS306-MAT α 2-STOP по сайту SpeI (Рис. 10, А), pCEN-UG по сайту NotI (Рис. 10, Г), pRS306-trp1-2 Δ по сайту HindIII (Рис. 10, Б), UIRL-MAT по сайту PvuI (Рис. 10, В).

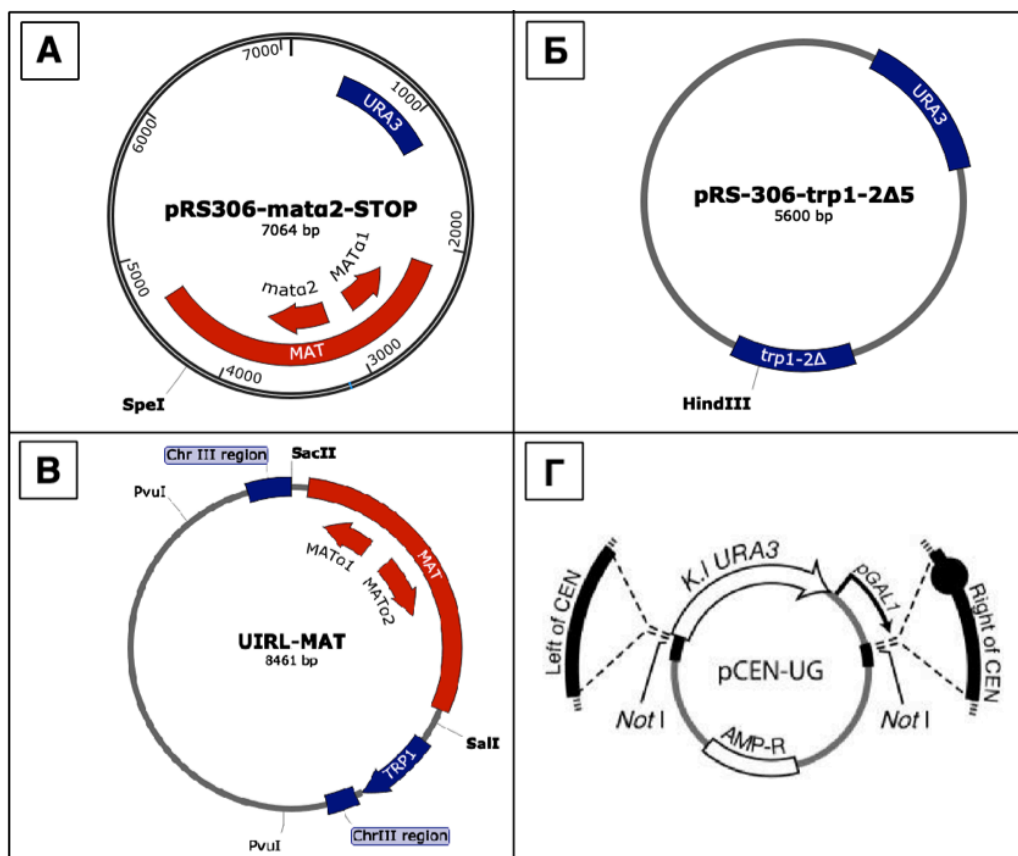


Рисунок 10. Карты плазмид. А – pRS306-mata2-STOP; Б – pRS306-trp1-2Δ; В - UIRL-MAT; Г - pCEN-UG (Reid et al., 2008).

3. Среда и условия культивирования

Дрожжи выращивали на полных средах: жидкой и твердой среде YEPD (Инге-Вечтомов, 1971; Rose et al., 1990), и минимальной среде MD (минимальная дрожжевая среда по рецепту Yeast Nitrogen Base), содержащей необходимые аминокислоты, азотистые основания, витамины и микроэлементы (Rose et al., 1990). Аминокислоты и азотистые основания добавляли в среду в следующих концентрациях: L-гистидин – 20 мг/л, L-лизин – 30 мг/л, аденин – 20 мг/л, урацил – 20 мг/л, L-треонин – 150 мг/л, L-лейцин – 60 мг/л, L-метионин – 20 мг/л, L-триптофан - 20 мг/л. Среда для отбора гибридов готовили на основе MD с добавлением аминокислот и азотистых оснований, необходимых для роста гибридов, но не родительских штаммов – урацил, гистидин, лейцин и треонин в стандартных концентрациях. Для отбора мутантов по гену *URA3* использовали среду с 5-фтороротовой кислотой (5-FOA), которая содержала Yeast Nitrogen Base (YNB) (6,7 г/л), D-глюкозу (20 г/л), все необходимые аминокислоты и аденин в стандартной концентрации, урацил 50 мг/л и 5-FOA 1 г/л. Полную среду YEPGal готовили по рецепту YEPD с добавлением 2% галактозы вместо глюкозы. Для приготовления твердых сред использовали агар фирмы «Хеликон» в концентрации 20 г/л. Дрожжи выращивали при температуре 30°C.

4. Трансформация

4.1 Трансформация дрожжей *S. cerevisiae*

Трансформацию дрожжей *S. cerevisiae* проводили методом, описанным ранее (Soni et al., 1993), с незначительными модификациями:

1. Колонию дрожжей засекали в жидкую среду YEPD с добавлением аденина до конечной концентрации аденина в среде 100 мг/л.
2. Дрожжевую культуру инкубировали в течение ночи при 30°C на качалке при постоянном перемешивании.
3. Ночную культуру дрожжей разбавляли в 4 раза свежей средой YEPD добавлением аденина (100 мг/л) и растили еще 2-3 часа при тех же условиях.
4. На одну реакцию трансформации в пластиковую 1,5 мл центрифужную пробирку отбирали 1,5 мл свежей культуры дрожжей.
5. Клетки осаждали центрифугированием 3 мин при 3 тыс. об/мин.
6. Супернатант сливали, а к клеткам дрожжей в каждую пробирку добавляли 6 мкл ДНК-носителя (раствор денатурированной ДНК тимуса теленка).
7. В каждый опытный вариант, за исключением контрольного, добавляли 1-15 мкл (в зависимости от концентрации) трансформирующей ДНК, перемешивали содержимое пробирок.
8. В каждую пробирку приливали 500 мкл раствора PEG/LiAc/TE (40% PEG-4000, 0,1 M LiAc, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 и 1 mM EDTA, pH 8,0) и 56 мкл ДМСО.
9. Содержимое пробирок перемешивали на лабораторном миксере «Eppendorf» 15 минут при комнатной температуре.
10. Пробирки инкубировали на водяной бане при 42°C 15 минут.
11. Клетки осаждали центрифугированием 3 мин при 3 тыс. об/мин.
12. Супернатант сливали.
13. Клетки высевали на селективную среду для отбора трансформантов.

4.2 Трансформация бактерий *E. coli*

Бактериальную трансформацию проводили по стандартному протоколу (Inoue et al., 1990):

1. К размороженным на льду компетентным клеткам (100 мкл) добавляли 1-2 мкл трансформирующей ДНК.
2. Полученную смесь инкубировали 30 минут на льду.

3. Далее смесь подвергали тепловому шоку 45 секунд на водяной бане при 42°C, после чего к клеткам быстро добавляли 1 мл теплой (37°C) жидкой среды LB.
4. Клетки инкубировали при 37°C 1 час.
5. Суспензию клеток высевали на твердую среду LB с ампициллином.
6. Трансформанты инкубировали при 37°C 16-24 часа.

5. Молекулярно-генетические методы

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили по стандартному протоколу (Маниатис и др, 1984). Для амплификации фрагмента локуса *MATα* использовали праймеры:

intramatalpha2 5'-TCTATCGTTTTCTATGCTGCGC

MAT-rv 5'-GCATTTGTTCATCCGTCCC

Использовали следующую программу ПЦР, представленную в таблице 3.

Таблица 3. Программа ПЦР для амплификации фрагмента локуса *MATα*.

Этап	Количество циклов	Температура	Длительность
1	1 цикл	95°C	30''
2	35 циклов	95°C	40''
		50°C	60''
		72°C	90''
3	1 цикл	72°C	5'

Для экстракции хромосомной ДНК из дрожжей использовали набор Masterpure Yeast DNA Purification Kit фирмы «Illumina» согласно рекомендациям производителя.

Рестрикцию проводили в соответствии с рекомендациями фирм-производителей эндонуклеаз рестрикции.

Выделение плазмидной ДНК из бактерий проводили согласно стандартному протоколу (Маниатис и др, 1984).

Лигирование плазмидной ДНК проводили согласно рекомендациям производителя фермента лигазы фага T4 (New England Biolabs).

6. Методы частной генетики дрожжей

В работе использовали такие методы частной генетики дрожжей, как: методы скрещивания и отбора гибридов, метод селективных сред, метод получения индивидуальных клонов при посеве истощающим штрихом, метод серийных разведений, метод отпечатков, метод определения типа спаривания по способности образовывать гибриды с тестерными штаммами (с известным стабильным типом спаривания) (Rose et al., 1990; Захаров и др., 1984).

7. Альфа-тест

9-10 независимых культур тестерных штаммов растили в жидкой среде YEPD в течение 16 часов при 30°C на качалке. При тех же условиях растили культуру штамма-партнера для скрещивания. Для подсчета частоты «незаконной» гибридизации по 50 или 100 мкл суспензии клеток из каждой культуры тестерного штамма и 100 или 200 мкл ночной культуры штамма-партнера для скрещивания высевали совместно на селективную среду для отбора «незаконных» гибридов. Параллельно подходящие разведения клеток тестерного штамма высевали на среду YEPD для оценки выживаемости. В экспериментах с использованием УФ-излучения облучение клеток тестерного штамма ультрафиолетовым светом с длиной волны 264 нм проводили на твердой селективной и полной средах, а затем к тестерному штамму на среду для отбора гибридов подсеивали штамм-партнер для скрещивания. Источником излучения служила лампа ДБ30 с мощностью излучения 2 Дж·с/м². Доза облучения составляла 10-40 Дж/м². Чашки инкубировали 3 дня при 30°C. Подсчитывали число выросших колоний на каждой чашке. Общую частоту «незаконной» гибридизации в каждом случае вычисляли по формуле

$$F = \frac{(M \times a)}{(N \times b)}$$

где М – число колоний, выросших на среде для отбора «незаконных» гибридов, N – число колоний, выросших на полной среде, а и b – соответствующие факторы разведения.

Отобранных «незаконных» гибридов распределяли по классам в соответствии с их фенотипом: типом спаривания и наличием ауксотрофностей по гистидину и треонину. Для определения типа спаривания отобранные «незаконные» гибриды скрещивали с тестерными штаммами а и α типов спаривания, ауксотрофными по гистидину (2Г-П2345 и 78А-П2345). По способности «незаконных» гибридов скрещиваться с тестерными штаммами идентифицировали тип спаривания α или некопулирующий (n/m). Долю гибридов каждого класса определяли как отношение числа гибридов данного класса к общему числу проверенных «незаконных» гибридов. Частоту гибридов каждого класса определяли перемножением общей частоты «незаконной» гибридизации на долю данного

класса. Для каждого варианта экспериментальных условий (тестерный штамм и доза УФ) было отобрано и проверено не менее 490 «незаконных» гибридов.

8. Качественное определение частоты возникновения «незаконных» гибридов

Штамм-партнер для скрещивания высевали на чашки со средой YEPD широкими горизонтальными штрихами, после чего отпечатывали на чашки YEPD, на которые предварительно высевали тестерный штамм длинными вертикальными штрихами. После инкубации в течение суток чашки отпечатывали на среду для отбора гибридов, содержащую Ura, Leu, His и Thr. О частоте «незаконной» гибридизации судили по числу колоний гибридов, выросших на перекрестиях штрихов двух скрещиваемых штаммов.

9. Статистические методы

При определении частоты гибридизации использовали стандартные методы вычисления медиан и метод вычисления доверительных интервалов для медиан. Число наблюдений в каждом случае было 6-10. Частоту классов «незаконных» гибридов определяли как произведение доли класса на общую частоту «незаконной» гибридизации. Для значения частоты каждого класса определяли медиану и доверительный интервал (Глотов и др., 1982). Статистическую значимость различий между значениями частоты гибридизации у разных штаммов и на фоне УФ-излучения устанавливали при помощи непараметрического критерия Манна-Уитни при $P < 0,05$ (Гланц, 1999).

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Модификация тестерного штамма, используемого в альфа-тесте, путём внесения мутации *mata2* и проверка эффективности этой модификации в тесте на «незаконную» гибридизацию

Для повышения чувствительности тестерного штамма K5-35B-Д924 к мутагенным воздействиям, исследуемым в альфа-тесте, мы внесли преждевременный стоп-кодон UAA в ген *MAT α 2* методом двухшагового замещения. Для этого была использована интегративная плаزمида pRS306-MAT α 2-STOP, несущая полноразмерный локус *MAT α* с мутантной аллелью *mata2*. Клетки дрожжей трансформировали плазмидой pRS306-MAT α 2-STOP, линеаризованной рестриктазой *SpeI*. Для отбора трансформантов использовали среду без урацила. Затем отобранных трансформантов высевали на среду с фтороротовой кислотой (FOA) для селекции клонов, у которых произошло выщепление плазмиды из хромосомы. Полученные таким образом клоны анализировали по фенотипу: проверяли наличие ауксотрофностей и тип спаривания. Отбирали клоны, обладающие фенотипом n/m Ura⁻, что является следствием успешного замещения аллели *MAT α 2* дикого типа на мутантную *mata2*. Полученный штамм получил название А-K5-35B-Д924. Наличие мутации в гене *MAT α 2* штамма А-K5-35B-Д924 подтверждали секвенированием. Для этого фрагмент локуса *MAT* амплифицировали методом ПЦР с использованием праймеров *intramata α 2* и *MAT-gv* (см. раздел «Материалы и методы»), а полученный ПЦР фрагмент секвенировали в ресурсном центре СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий».

Полученный таким образом тестерный штамм А-K5-35B-Д924 с мутацией *mata2* и исходный штамм дикого типа по локусу *MAT α* были использованы для проведения тестов на «незаконную» гибридизацию без каких-либо мутагенных воздействий и при облучении УФ. В качестве партнера для скрещивания, позволяющего регистрировать события переключения типа спаривания n/m \rightarrow а и $\alpha \rightarrow$ а по формированию «незаконных» гибридов, использовали диплоидный штамм Д926, гомозиготный по *MAT α* , *his4 Δ* и *thr4 Δ* . Мы определили частоту «незаконной» гибридизации указанных штаммов. Результаты представлены в виде графика (Рис. 11). У обоих тестерных штаммов частота «незаконной» гибридизации повышалась после обработки УФ-излучением. При этом наличие мутации *mata2* в геноме тестерного штамма приводит к 10-кратному увеличению общей частоты «незаконной» гибридизации, как спонтанной, так и индуцированной УФ-излучением по сравнению со штаммом дикого типа.

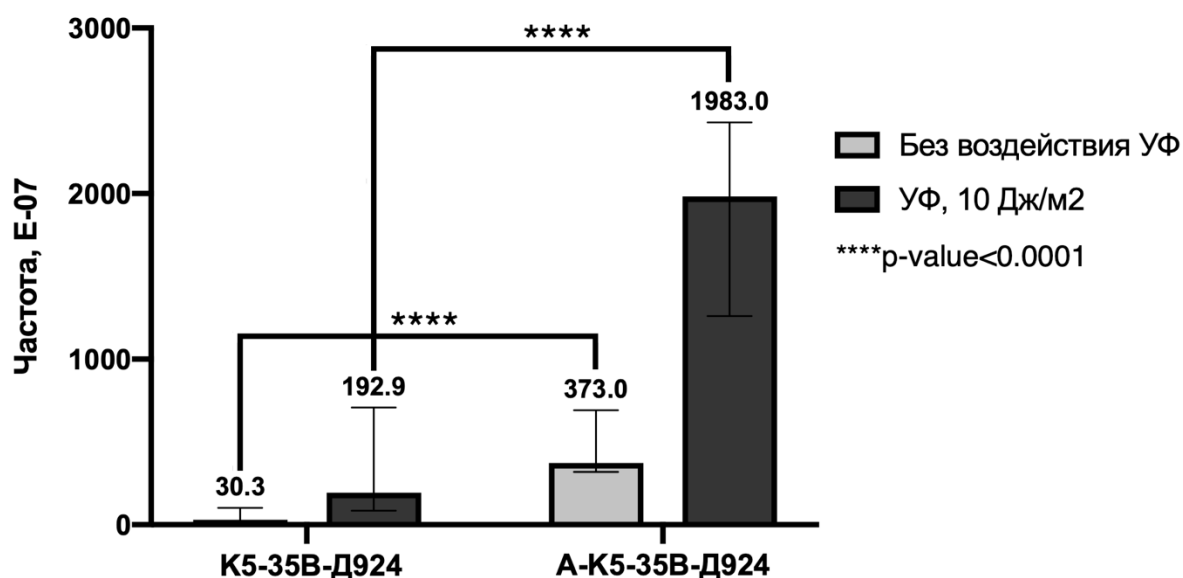


Рисунок 11. Частота «незаконной» гибридизации в скрещивании штаммов K5-35B-D924 (*MATa2*) × Д926 и A-K5-35B-D924 (*mata2*) × Д926. На рисунке представлены медиана и доверительный интервал (n=10).

Для того, чтобы понять за счет каких генетических событий происходит увеличение частоты «незаконной» гибридизации на фоне мутации *mata2* мы оценили частоту всех событий, учитываемых в альфа-тесте при скрещивании штаммов K5-35B-D924 (*MATa2*) × Д926 и A-K5-35B-D924 (*mata2*) × Д926. Так, была определена частота потери хромосомы III, ее правого плеча, конверсии *HMRa* → *MATa*, рекомбинации между *HMRa* и *MATa*, а также частота класса «мутации и временные повреждения». Для этого мы отобрали приблизительно 600 гибридов для каждого варианта экспериментальных условий (пара скрещиваемых штаммов и доза УФ-излучения). Затем проверили фенотип отобранных «незаконных» гибридов: наличие ауксотрофности по треонину и гистидину (маркеры хромосомы III) и тип спаривания. Полученные результаты позволили нам определить частоту отдельных генетических событий, учитываемых в альфа-тесте. Результаты представлены в таблице 4. Как видно из таблицы 4, увеличение частоты «незаконной» гибридизации на фоне мутации *mata2* происходит в основном за счет увеличения частоты класса «мутации и временные повреждения», как спонтанно, так и при облучении УФ. При этом частота остальных классов у мутанта *mata2* либо вообще не изменяется, либо меняется в гораздо меньшей степени. Данные, полученные в экспериментах по влиянию мутации *mata2* на общую частоту «незаконной» гибридизации и частоту отдельных классов «незаконных» гибридов, соответствуют ожидаемым и укладываются в модель, согласно которой переключение типа спаривания $\alpha \rightarrow a$ за счет временных повреждений и генных мутаций происходит реже, чем переключение типа спаривания $n/m \rightarrow a$, поскольку в

первом случае необходима одновременная инактивация обоих генов локуса *MAT*, а во втором случае только одного гена. Частота хромосомных нарушений, учитываемых в альфа-тесте, не зависит от наличия в геноме тестерного штамма мутации в одном из генов *MATa*, что также соответствует ожидаемым результатам.

Таблица 4. Частота различных генетических событий, учитываемых в альфа-тесте, при скрещивании штаммов К5-35В-Д924 (*MATa2*) × Д926 и А-К5-35В-Д924 (*mata2*) × Д926.

Штамм	УФ, Дж/м ²	Частота генетических событий, учитываемых в альфа-тесте × 10 ⁻⁷ (медиана и доверительный интервал)				
		Мутации и первичные повреждения в локусе <i>MATa</i>	Потеря правого плеча III хромосомы	Потеря III хромосомы	Конверсия кассеты <i>HMRa</i> в локус <i>MATa</i>	Рекомбинаци я <i>MATa</i> и <i>HMRa</i>
К5-35В- Д924	0	7,33 (5,4-12,0)	36,2 (26,9-59,6)	15,6 (11,5-25,6)	1,0 (0,7-1,7)	0,9 (0,7-1,5)
	10	105,8 (58,2-137,1)	91,7 (50,4-118,8)	20,2 (11,1-26,2)	3,2 (1,8-4,3)	8,9 (4,9-11,5)
А-К5- 35В- Д924	0	463,6**** (281,5-599,9)	26,3* (15,9-34,1)	18 (10,9-23,3)	5,2**** (3,2-6,8)	-
	10	676,5**** (478,7-955,6)	55,1* (38,9-77,8)	13,2 (9,3-18,6)	5,9** (4,2-8,4)	2,4**** (1,7-3,4)

Примечание: значения частоты для штамма с мутацией *mata2*, которые статистически значимо отличаются от значения для штамма дикого типа в тех же условиях, отмечены * (*p-value<0,05; **p-value=0,001; ***p-value=0,0001; ****p-value<0,0001).

2. Генетическая модификация дрожжевого штамма, используемого в альфа-тесте в качестве партнёра для скрещивания и проверка его эффективности

Для того чтобы упростить проведение альфа-теста и тем самым сократить временные и материальные затраты при тестировании потенциальных мутагенов, мы провели исследования, направленные на проверку возможности объединения тестов на «незаконную» гибридизацию и «незаконную» цитодукцию в рамках одной процедуры. Мы

предположили, что этому может способствовать подход, позволяющий индуцировать потерю хромосомы III, полученной «незаконными» гибридами от штамма-партнёра для скрещивания. В этом случае мы получили бы возможность, изучить не только фенотип «незаконного» гибрида, несущего хромосому III обоих родителей, но и фенотип штамма, несущего только хромосому III тестерного штамма, как и в тесте на незаконную цитодукцию. Реализации этого подхода могло помешать то, что в альфа-тесте в качестве партнера для скрещивания используют диплоидный штамм, гомозиготный по локусу *MATa*. Это необходимо для того, чтобы снизить влияние генетических нарушений в локусе *MATa* штамма-партнера для скрещивания на результаты альфа-теста, так как ранее было показано (Репневская, 1989; Андрейчук, 2012), что наличие двух и более копий локуса *MATa* существенно снижает частоту «незаконной» гибридизации. Однако для эффективной потери хромосомы III необходимо в качестве партнера для скрещивания использовать гаплоидный штамм. Мы предположили, что это противоречие может быть решено при использовании в альфа-тесте в качестве партнера для скрещивания гаплоидного штамма, несущего *MATa* в его естественном положении – в правом плече хромосомы III, дополнительный локус *MATa* в левом плече, а также конструкцию в центромере хромосомы III, позволяющую индуцировать потерю этой хромосомы на среде с галактозой (см. «Обзор литературы», Рис. 8, б). Перед тем как приступить к получению такого штамма мы проверили саму возможность объединения тестов на «незаконную» гибридизацию и цитодукцию в одном. Для этого мы получили гаплоидный штамм альфа типа спаривания, несущий галактозный промотор в центромере хромосомы III и апробировали его в альфа-тесте, где в качестве тестерного штамма использовали K5-35B-Д924 (*MATa2*) и A-K5-35B-Д924 (*mata2*).

2.1 Получение штамма G-10B-OM5, несущего промотор *pGAL1* в центромере хромосомы III и проверка эффективности этой модификации

Для получения гаплоидного штамма G-10B-OM5, несущего промотор *pGAL1* в центромере хромосомы III в качестве исходного использовали штамм 10B-OM5. Этот штамм трансформировали плазмидой pCEN-UG, гидролизованной NotI. Трансформантов отбирали на среде без урацила. Для проверки наличия вставки была использована среда с галактозой. Штаммы, в которых эффективно происходит транскрипция в центромерной области, часто теряют соответствующую хромосому и поэтому характеризуются отсутствием роста на среде с галактозой. По этому критерию мы отобрали трансформантов, несущих промотор *pGAL1* в центромере хромосомы III.

Для того, чтобы проверить насколько эффективно происходит потеря хромосомы III с вставкой *pGAL1* в центромере, мы отобрали 16 «незаконных» гибридов в скрещиваниях K5-35B-Д924 × G-10B-ОМ5 и А-K5-35B-Д924 × G-10B-ОМ5, относящихся к классу «мутации и временные повреждения» и проверили фенотип этих гибридов до и после пассирования на среде с галактозой.

Проверка фенотипов этих «незаконных» гибридов после двух пассажей на среде с галактозой показала, что потеря хромосомы III происходит эффективно, причем, уже после первого пассажа у части гибридов происходила элиминация хромосомы III, полученной гибридом от штамма G-10B-ОМ5; после двух пассажей на среде с галактозой все проверенные «незаконные» гибриды потеряли способность расти на среде без урацила. Дополнительным свидетельством того, что происходила эффективная потеря хромосомы III на среде с галактозой является следующий факт: все «незаконные» гибриды в скрещивании А-K5-35B-Д924 × G-10B-ОМ5 имели тип спаривания α, а после двух пассажей на среде с галактозой они приобретали тип спаривания n/m, что является фенотипическим проявлением мутации в локусе *MATα* родительского штамма А-K5-35B-Д924 и свидетельствует об элиминации III хромосомы от штамма G-10B-ОМ5. При этом у гибридов от скрещивания K5-35B-Д924 × G-10B-ОМ5 обнаруживается тип спаривания α, как и у гибридов от скрещивания контрольных штаммов K5-35B-Д924 и 10B-ОМ5. Фенотип гибридов после элиминации хромосомы III штамма партнера для скрещивания указывает на то, что все проверенные «незаконные» гибриды произошли в результате временного повреждения локуса *MATα* тестерного штамма. Таким образом, мы установили, что данная модификация эффективна и может быть использована в дальнейшем для совершенствования альфа-теста.

2.2 Конструирование штамма GM-10B-ОМ5, несущего дополнительную копию локуса *MATα* в левом плече и промотор *pGAL1* в центромере хромосомы III и проверка эффективности его использования в альфа-тесте

Для конструирования штамма GM-10B-ОМ5 в качестве исходного был взят штамм 10B-ОМ5. Модификацию исходного штамма проводили в несколько этапов (Рис. 12):

1. В базовый штамм 10B-ОМ5 (Рис. 12, А). внести селективный маркер *trp1-2Δ* с использованием плазмиды pRS306-TRP1-2Δ (Рис. 12, Б).
2. Сконструировать плазмиду UIRL-MAT, несущую участок с локусом *MATα* и геном *TRP1*, фланкированным фрагментами левого плеча хромосомы III на основе плазмид UIRL-Ytel11/1 и pRS306-MAT.

3. Трансформировать полученный на первом этапе штамм 10B-OM5-*trp1* с фрагментом плазмиды UIRL-MAT для встраивания *MATa* в левое плечо хромосомы III (селекция трансформантов на среде без триптофана) (Рис. 12, В).
4. Штамм, полученный на третьем этапе (М-10B-OM5) трансформировать плазмидой pCEN-UG для внесения промотора *pGAL1* в центромеру хромосомы III (Рис. 12, Г).

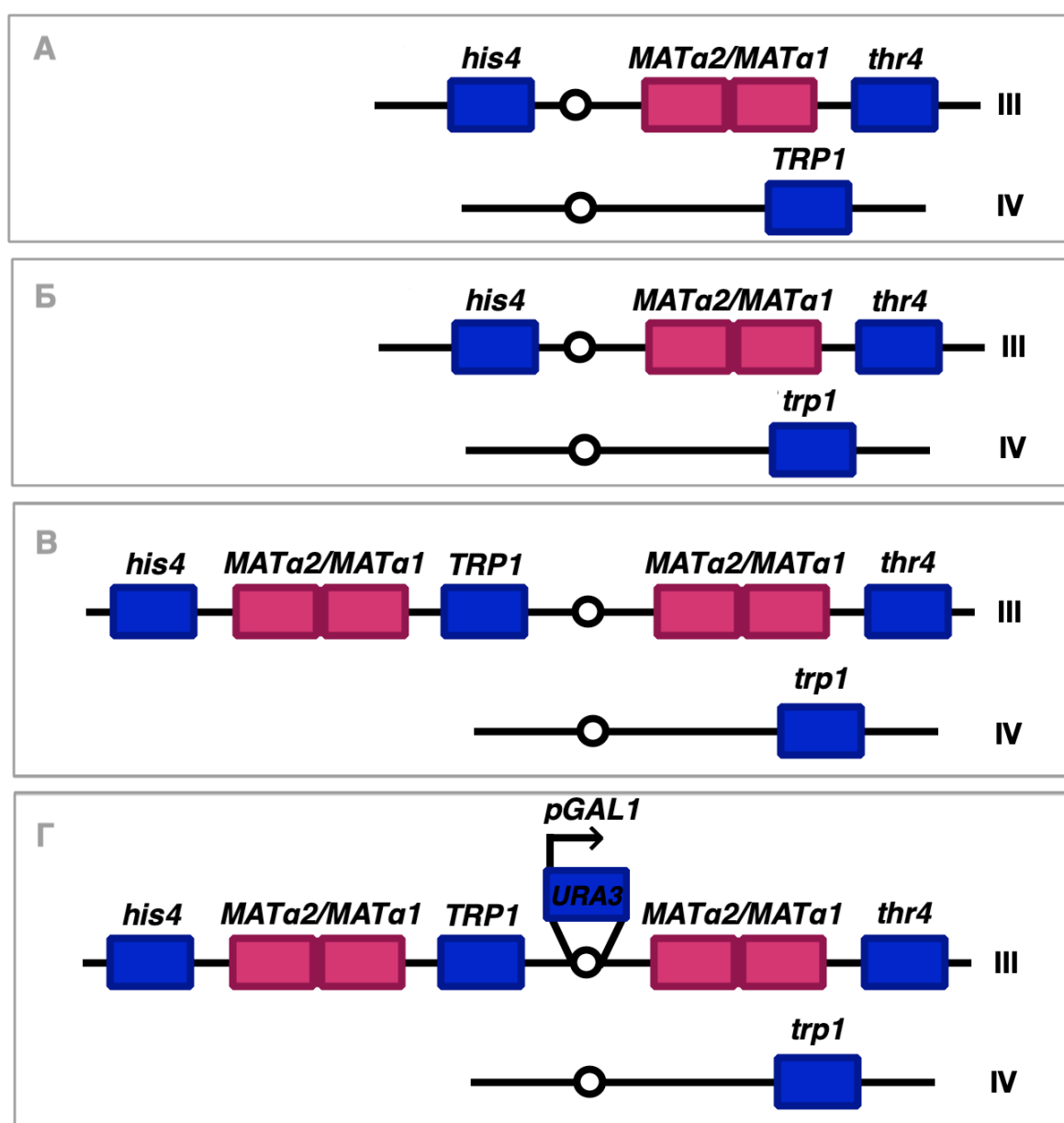


Рисунок 12. Схема получения штамма GM-10B-OM5.

В качестве селективного маркера для отбора трансформантов, несущих дополнительную копию *MATa* в левом плече был выбран ген *TRP1*. Поскольку исходный штамм 10B-OM5 является прототрофом по триптофану, на первом этапе конструирования штамма GM-10B-OM5 мы в исходном штамме 10B-OM5 заменили аллель дикого типа *TRP1*

на мутантную *trp1-2Δ*, представляющую собой делецию двух нуклеотидов в кодирующей области *TRP1*. Для получения мутанта *trp1-2Δ* использовали метод двухшагового замещения гена. При этом исходный штамм 10B-OM5 трансформировали плазмидой pRS306-*trp1-2Δ*, предварительно линеаризованной рестриктазой HindIII. Трансформантов отбирали на среде без урацила. Затем трансформантов высевали на среду с FOA для отбора клонов, у которых произошло выщепление плазмиды и замещение аллели *TRP1* на *trp1-2Δ*, по наличию ауксотрофности по урацилу и триптофану. Полученный штамм получил название 10B-OM5-*trp1*.

Для конструирования плазмиды UIRL-MAT исходные плазмиды UIRL-Ytel11/1 и pRS306-MAT были гидролизваны по сайтам SacII и SalI, после чего рестрикционные фрагменты разделяли в агарозном геле с помощью гель-электрофореза. Для получения плазмиды UIRL-MAT использовали фрагмент плазмиды UIRL длиной 5700 п.о. и фрагмент плазмиды pRS306-MAT длиной 2761 п.о. Очищенные из агарозного геля фрагменты лигировали с использованием лигазы фага T4 производства New England Biolabs. Затем лигазной смесью трансформировали *E. coli* (штамм DH5α), трансформантов отбирали на среде LB с ампицилином (50 мг/л). Наличие вставки в плаزمиде, выделенной из *E. coli*, проверяли методом рестрикционного анализа. Для этого полученные плазмиды гидролизвали ферментом HpaI, сайты узнавания которого находятся в обоих фрагментах, использованных при лигировании. Для дальнейшей работы отобрали препараты плазмидной ДНК, размер рестрикционных фрагментов которых соответствовал ожидаемому (Рис. 13). Таким образом, плазмида UIRL-MAT была успешно получена.

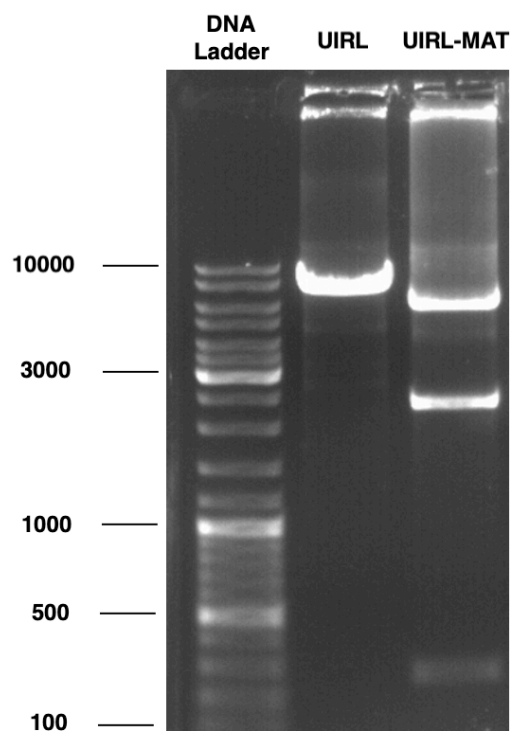


Рисунок 13. Результаты рестрикционного анализа полученной плазмиды UIRL-MAT и исходной плазмиды UIRL-Ytel11/1.

Далее была проведена трансформация штамма 10B-OM5-trp1 полученной плазмидой UIRL-MAT, линеаризованной рестриктазой PvuI. Трансформантов отбирали на среде без триптофана. Восемь независимых трансформантов использовали в качественном тесте на «незаконную» гибридизацию в скрещивании со штаммом K5-35B-Д924 при облучении УФ (40 Дж/м²) и без мутагенного воздействия (Рис. 14), в качестве контроля использовали исходный штамм 10B-OM5.

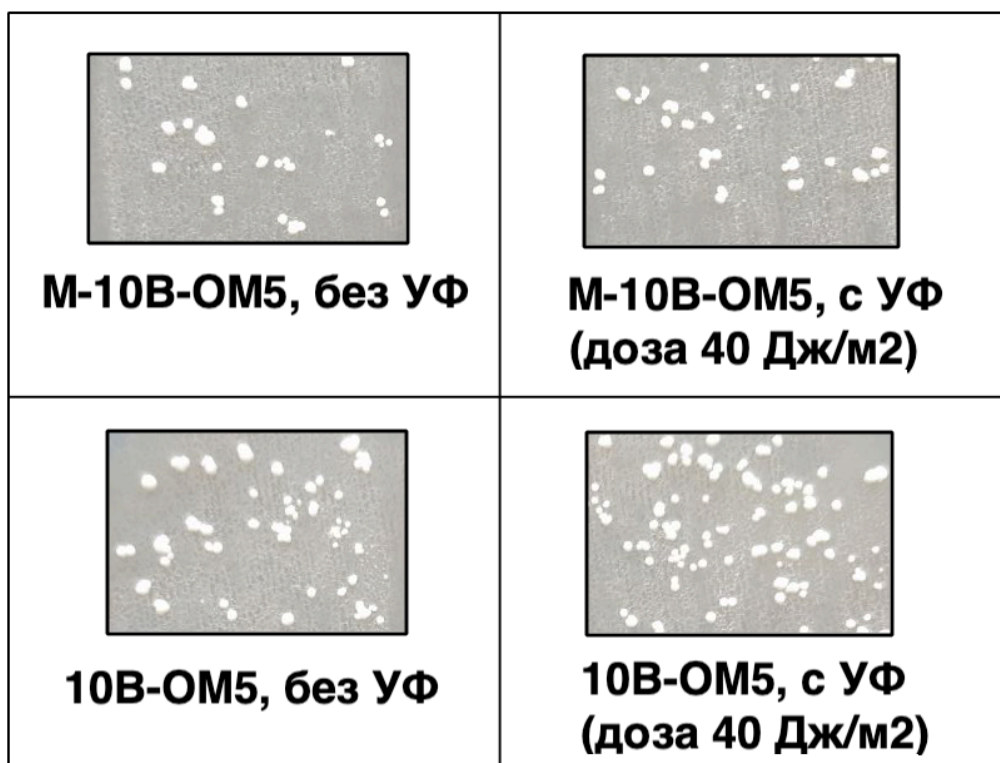


Рисунок 14. Результаты качественного теста на частоту возникновения «незаконных» гибридов в скрещивании М-10В-ОМ5 и 10В-ОМ5 со штаммом К5-35В-Д924.

По результатам качественного теста были отобраны клоны, у которых как спонтанно, так и при облучении УФ частота «незаконной» гибридизации была ниже, чем у исходного штамма с единственным локусом *MATa* (Рис 14). Полученный таким образом штамм М-10В-ОМ5 был использован для дальнейшей трансформации плазмидой рCEN-UG. Вставку промотора *pGAL1* в центромеру хромосомы III осуществляли так же, как и при создании штамма G-10В-ОМ5: трансформантов плазмидой рCEN-UG отбирали на среде без урацила, проверку наличия вставки проводили на среде с галактозой. Штаммы, несущие промотор *pGAL1* в центромере хромосомы III, были отобраны по отсутствию роста на данной среде с галактозой. Для этого 21-кратные разведения 48-часовой культуры штаммов 10В-ОМ5 и GM-10В-ОМ5 наносили с помощью репликатора на полную среду YEPD и на среду с галактозой YEPGal (Рис. 15). Таким образом был получен штамм GM-10В-ОМ5, который, являясь гаплоидом, несет в левом плече хромосомы III дополнительный локус *MATa* и промотор *pGAL1* в центромере той же хромосомы.

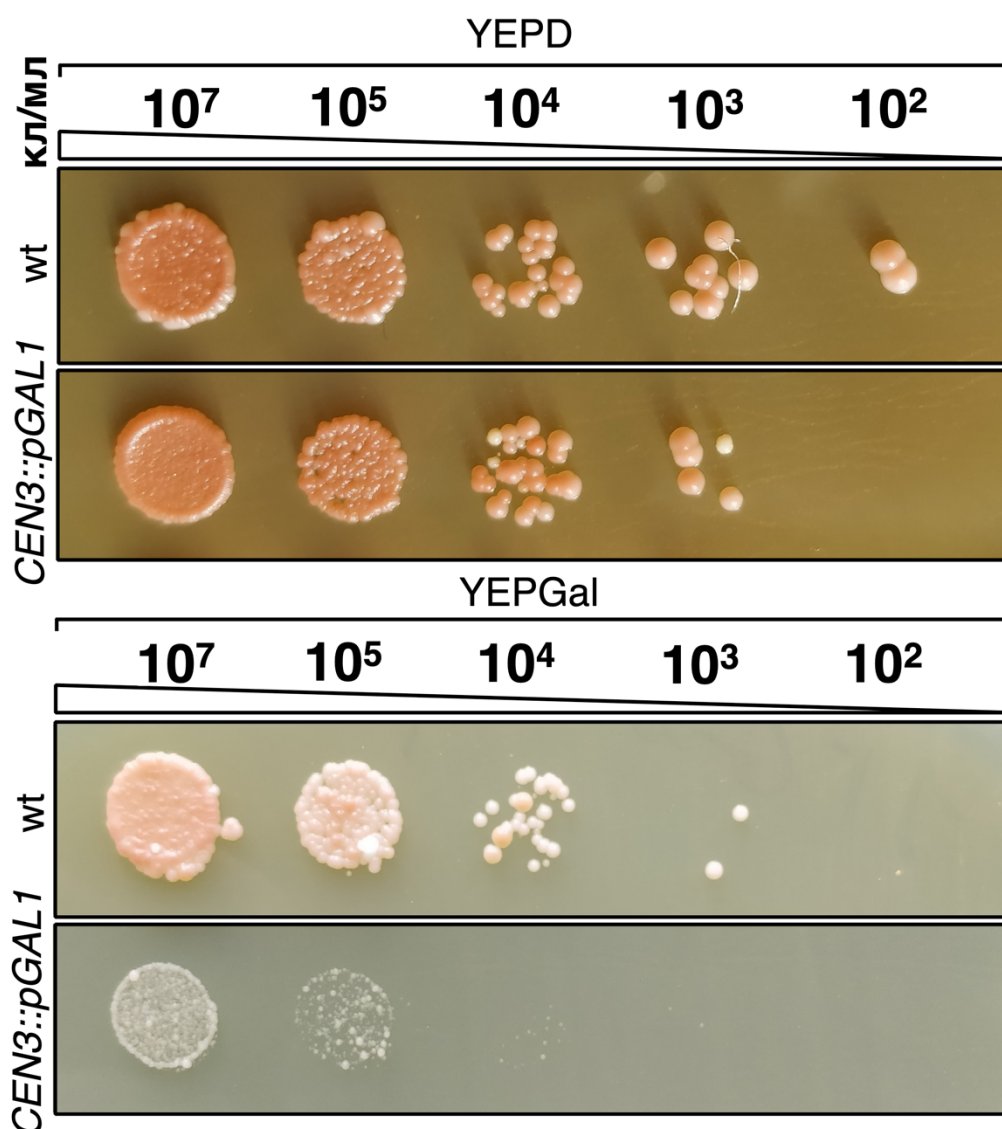


Рисунок 15. Рост штаммов 10B-OM5 (*wt*) и GM-10B-OM5 (*CEN3::pGAL1*) на полной среде с глюкозой (YEPD) и на среде с галактозой (YEPGal).

Дополнительно мы провели количественную оценку влияния дополнительной копии локуса *MAT α* в левом плече хромосомы III на частоту «незаконной» гибридизации (Рис. 16). Были поставлены скрещивания следующих штаммов:

1. K5-35B-Д924 \times 10B-OM5
2. K5-35B-Д924 \times GM-10B-OM5
3. A-K5-35B-Д924 \times 10B-OM5
4. A-K5-35B-Д924 \times GM-10B-OM5

Тенденция к снижению частоты «незаконной» гибридизации при использовании штамма GM-10B-OM5 с дополнительным локусом *MAT* наблюдается, однако она весьма небольшая и воспроизводится нестабильно. При сравнении частоты «незаконной»

гибридизации в скрещиваниях №1 и №2 разница является статистически значимой ($p < 0.05$), но не является значимой при сравнении скрещиваний №3 и №4 (Рис. 16).

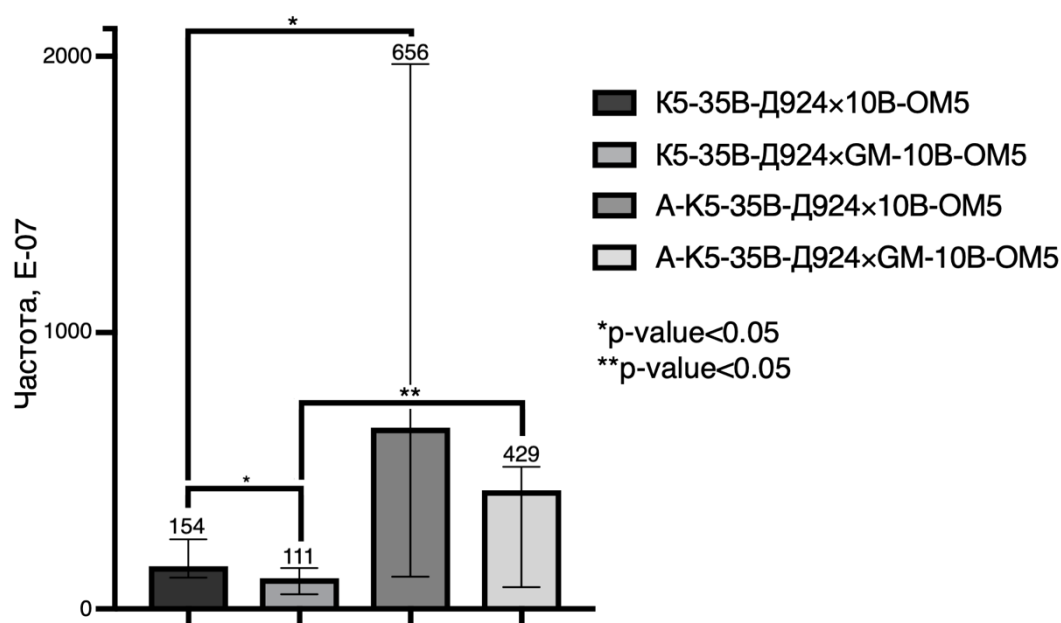


Рисунок 16. Частота возникновения «незаконных» гибридов в скрещиваниях K5-35B-Д924 × 10B-ОМ5, K5-35B-Д924 × GM-10B-ОМ5, A-K5-35B-Д924 × 10B-ОМ5 и A-K5-35B-Д924 × GM-10B-ОМ5. На рисунке представлены медиана и доверительный интервал (n=9).

ОБСУЖДЕНИЕ

Целью нашей работы являлось совершенствование тест-системы для выявления потенциальных мутагенных факторов путем внесения ряда модификаций в геном используемых в альфа-тесте штаммов дрожжей *S. cerevisiae*. Предложенные нами модификации, как мы ожидали, должны были с одной стороны повысить чувствительность альфа-теста, а с другой упростить процедуру тестирования. Для повышения чувствительности тест-системы мы инактивировали ген *MATa2* у тестерного штамма, который при проведении альфа-теста подвергается обработке мутагенными факторами и служит индикатором их мутагенной активности. Мы получили данные, указывающие на то, что наличие мутации *mata2* в тестерном штамме на порядок повышает частоту «незаконной» гибридизации и таким образом способствует увеличению чувствительности разрабатываемой тест-системы. В различных вариантах теста на «незаконную» гибридизацию с разными партнерами для скрещивания (Д926, 10B-ОМ5 и GM-10B-ОМ5) данный тестерный штамм стабильно показывает значительное увеличение общей частоты «незаконной» гибридизации (Рис. 11 и 16?). Однако, частота различных генетических событий, учитываемых в альфа-тесте, на фоне мутации *mata2* изменяется неравномерно

(Табл. 4, раздел 3 «Результаты»). Частота возникновения «незаконных» гибридов фенотипического класса «мутации и первичные повреждения в локусе *MATα*», возрастает наиболее заметно: с $7,33 \times 10^{-7}$ до $463,6 \times 10^{-7}$ без воздействия УФ (приблизительно в 63 раза) и со $105,8 \times 10^{-7}$ до $676,5 \times 10^{-7}$ при облучении УФ в дозе 10 Дж/м^2 (приблизительно в 6 раз). Данные о влиянии мутации *mata2* на частоту «незаконной» гибридизации соответствует ожидаемым. Поскольку вероятность инактивации одного гена выше, чем одновременная инактивация двух генов, переключение типа спаривания $n/m \rightarrow a$ происходит с намного большей вероятностью, чем $\alpha \rightarrow a$, что можно зафиксировать по увеличению частоты «незаконной» гибридизации. Изменение частоты остальных учитываемых в альфа-тесте генетических событий у мутанта *mata2* по сравнению с *wt* не значительны, хотя статистически значимы: происходит небольшое (в 1,5 раза) повышение частоты конверсии кассеты *HMRa* в *MATα*, а также небольшое (по сравнению с изменениями в частоте класса «мутации и временные повреждения») снижение частоты потери правого плеча хромосомы III и частоты рекомбинации *HMRa* и *MATα*. Поэтому можно заключить, что частота хромосомных нарушений, учитываемых в альфа-тесте, не зависит от наличия в геноме тестерного штамма мутации в одном из генов *MATα*, что также соответствует ожидаемым результатам. Таким образом, использование полученного нами штамма А-К5-35В-Д924, несущего мутацию *mata2*, значительно повышает разрешающую способность альфа-теста в отношении генных мутаций и временных повреждений *MATα*. В отличие от классического варианта альфа-теста, когда скрещивают два штамма одинакового альфа типа спаривания, в предлагаемом нами варианте тест-системы с использованием мутанта *mata2*, используют скрещивание стерильного штамма n/m со штаммом α -типа спаривания. В последнем варианте, который мы предлагаем назвать n/m -тест, учитывают генетические нарушения, приводящие к переключению типа спаривания $n/m \rightarrow a$.

Для дальнейшего повышения чувствительности тестерного штамма перспективным может стать использование мутантов по генам различных систем репарации или генам, ответственным за биосинтез клеточной стенки, а также использование сверхэкспрессии генов ДНК-полимераз, способных осуществлять синтез на поврежденной матрице. Подобные модификации используются в тесте Эймса, являющемся «золотым стандартом» генетической токсикологии. Использование мутантов по клеточной стенке может увеличить чувствительность к мутагенным агентам за счет повышения ее проницаемости для химических веществ и физических факторов, а внося дефекты систем репарации и устойчивости к повреждениям можно повысить чувствительность к повреждениям или генным мутациям.

В работе нами были получены два штамма, один из которых несет мутацию *mata2*, а второй - промотор *pGAL1* в центромере хромосомы III. На примере штамма G-10B-OM5 было установлено, что внесение галактозного промотора в центромеру хромосомы III может быть использовано для объединения «незаконной» гибридизации и «незаконной» цитодукции в одну систему. После двух пассажей на галактозе все «незаконные» гибриды класса «мутации и временные повреждения», отобранные из скрещивания A-K5-35B-Д924 × G-10B-OM5, приобретали тип спаривания n/m и ауксотрофность по урацилу, что являлось фенотипическим проявлением мутации в гене *mata2* тестерного штамма и элиминации хромосомы III штамма партнера для скрещивания. Таким образом, данная модификация делает возможным объединение систем цитодукции и гибридизации, а также помогает решить ряд проблем, связанных с необходимостью использования системы цитодукции, сформулированных ранее: неоднородный генетический фон, обусловленный различием используемых в гибридизации и цитодукции штаммов, невозможность сопоставления частот генетических событий, полученных в двух системах альфа-теста и наличие артефактов в виде полиплоидных цитодуктантов (Ширяева, 2015).

Для снижения влияния генетических нарушений в геноме штамма-партнера для скрещивания на результаты альфа-теста мы предложили использовать ещё одну модификацию, а именно, ввести в левое плечо хромосомы III штамма-партнера дополнительный локус *MATa*. Мы ожидали, что такая модификация будет приводить к снижению частоты «незаконной» гибридизации за счет снижения нарушений в *MATa* штамма-партнера для скрещивания, но не тестерного штамма. Данный подход для совершенствования штамма-партнера для скрещивания показал низкую эффективность: снижение частоты «незаконной» гибридизации при внесении дополнительного локуса *MATa* в левое плечо III хромосомы было небольшим и находилось на границе статистической значимости. Такие небольшие изменения частоты «незаконной» гибридизации не сравнимы с данными о снижении частоты при внесении дополнительного локуса *MATa* иными способами. Так, ранее было показано, что при внесении дополнительного локуса *MATa* на центромерной плазмиде частота образования «незаконных» гибридов снижается приблизительно в 155 раз (Андрейчук, 2012), а при скрещивании дисомиков по хромосоме III, гомозиготных по локусу *MATa* автодиплоидов, и штаммов с дополнительным локусом *MATa* в другой хромосоме, образования «незаконных» гибридов практически не происходит (Репневская, 1989). Причины такого незначительного снижения частоты «незаконной» гибридизации при использовании предложенного нами подхода до конца не ясны, мы можем лишь выдвинуть несколько предположений, которые нуждаются в экспериментальной проверке. Мы полагаем, что это

может быть связано, в том числе, с повышением частоты спонтанной потери целой хромосомы III у полученного нами штамма из-за наличия вставки в центромерном участке. Для подтверждения или исключения такого варианта необходимы дополнительные исследования, где будет изучено влияние на частоту «незаконной» гибридизации дополнительного локуса *MATa* в левом плече хромосомы III как отдельной модификации, а не на фоне вставки промотора *pGAL1* в центромеру хромосомы III. Немаловажным является тот факт, что в полученном нами штамме оба локуса *MATa* находятся на одной хромосоме, поэтому для совершенствования штамма-партнера для скрещивания в данном направлении эффективным может оказаться внесение дополнительного локуса *MATa* на плазмиде, потерю которой можно легко индуцировать или в другой участок III хромосомы.

Таким образом, результаты, полученные нами в рамках данной работы, позволили выявить такие способы модификации штаммов, используемых в альфа-тесте, которые позволяют повысить чувствительность и эффективность тест-системы. Эти модификации были апробированы, а их эффективность проверена экспериментально. Кроме того, были предложены способы дальнейшего совершенствования альфа-теста и разработанного нами n/m-теста.

ВЫВОДЫ

1. Использование штамма *mata2* в качестве тестерного приводит к возрастанию общей частоты «незаконной» гибридизации и частоты отдельных классов «незаконных» гибридов по сравнению со штаммом *MATa2*, что приблизительно на порядок повышает чувствительность альфа-теста в отношении спонтанных и УФ-индуцированных нарушений генетического материала.
2. В наибольшей степени использование мутации *mata2* способствует повышению чувствительности альфа-теста в отношении класса «мутации и временные повреждения», но не в отношении хромосомных нарушений.
3. Установлено, что генетическая модификация штамма-партнера для скрещивания, заключающаяся в инсерции *pGAL1* в центромеру хромосомы III, эффективна для усовершенствования альфа-теста путем объединения тестов на «незаконную» гибридизацию и «незаконную» цитодукцию в рамках одной процедуры.
4. Дополнительная копия локуса *MATa*, внесенная в левое плечо хромосомы III, лишь незначительно снижает частоту образования «незаконных» гибридов, и поэтому такая модификация не эффективна для снижения влияния генетических нарушений в геноме штамма-партнера для скрещивания на общие результаты альфа-теста.

БЛАГОДАРНОСТИ

В первую очередь я бы хотела поблагодарить своего научного руководителя, Степченкову Елену Игоревну, за неоценимую помощь как в выполнении практических задач, так и в написании и оформлении выпускной квалификационной работы, а также за чуткое руководство и неисчерпаемое терпение. Также хотелось бы поблагодарить коллектив кафедры генетики и биотехнологии СПбГУ за предоставленную возможность выполнения работы и за полученные в ходе обучения знания. Отдельная благодарность Соповой Юлии Викторовне за ценные советы и замечания в процессе написания работы. Также выражаю благодарность сотрудникам ресурсного центра СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий» за предоставленную возможность выполнить у них часть своей работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абилов С.К., Глазер В.М. Мутагенез с основами генотоксикологии. Санкт-Петербург: Нестор-История, 2015., 304 с.
2. Андрейчук Ю.В. Идентификация событий, приводящих к переключению типа спаривания у гетероталлических штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Диссертация магистра, СПб, СПбГУ, 2012.
3. Гланц С. Медико – биологическая статистика. М.: Практика, 1998, С. 327-345.
4. Глотов Н.В., Животовский Л.А., Хованов Н.В., Хромов-Борисов Н.Н. Биометрия. Учебное пособие. Л.: Изд. ЛГУ, 1982, С. 264.
5. Жук А. С., Задорский С. П., Ширяева А. А., Коченова О. В., Инге-Вечтомов С. Г., Степченкова Е. И. Идентификация мутации *kar1-1*, приводящей к повышению частоты цитодукции и снижению частоты гибридизации у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Генетика. 2018. Т. 54, С. S18–S21.
6. Жук А.С. Фенотипическое проявление повреждений генетического материала, учитываемых в альфа-тесте у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Диссертация на соискание ученой степени к.б.н., СПб, СПбГУ, 2016.
7. Захаров И. А., Кожин С. А., Кожина Т. Н., Федорова И. В. Сборник методик по генетике дрожжей сахаромикетов. Л.: Наука, 1984, С. 143
8. Инге-Вечтомов С. Г. Идентификация некоторых групп сцепления у Петергофских генетических линий дрожжей // Генетика, 1971, Т. 7, № 9, С. 113-123.
9. Инге-Вечтомов С. Г., Репневская М. В., Карпова Т. С. Изучение скрещивание клеток одинакового типа спаривания у дрожжей сахаромикетов // Генетика. 1986, Т. 22, № 11, С. 2625-2636.
10. Коченова О.В., Борхсениус А.С., Степченкова Е.И., Инге-Вечтомов С.Г. Генетический контроль типов спаривания у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* как основа разработки тест-системы (α -тест) для оценки генетической активности эндогенных и экзогенных факторов// Фундаментальные основы инновационных биологических проектов в “Наукограде”/Сборник Трудов Биологического института. СПб, 2008, № 54. С.89-100.
11. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование, М. :Мир, 1984., 480 с.
12. Репневская М. В. Наследуемые и ненаследуемые изменения типа спаривания у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Дисс.канд.биол.наук., Ленинград, 1989, 210 с.

13. Репневская М. В., Кашкин П. К., Инге-Вечтомов С. Г. Модификационные изменения генетического материала у дрожжей сахаромикетов // Генетика. Т. 25, 1989, №3, С. 425 – 436.
14. Степченкова Е. И., Коченова О. В., Инге-Вечтомов С. Г. «Незаконная» гибридизация и «незаконная» цитодукция у гетероталличных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* как система для анализа генетической активности экзогенных и эндогенных факторов в «альфа-тесте» // Вестник Санкт-Петербургского университета. Сер. 3, 2009, Вып. 4, С. 129-140.
15. Ширяева А.А. Совершенствование тест-системы для генетической токсикологии: выявление нового класса событий, учитываемых в альфа-тесте у дрожжей *S. cerevisiae*. Диссертация магистра, СПб, СПбГУ, 2015.
16. Abraham J. Nasmyth K.A., Strathern J.N., Klar A.J.S., Hicks J.B. Regulation of mating-type information in yeast: Negative control requiring sequences both 5' and 3' to the regulated region// Mol Biol, 1984, V.176, P.307-331.
17. Aksenova A. Y., Greenwell P. W., Dominska M., Shishkin A. A., Kim J.C., Petes T. D., Mirkin S. M. Genome rearrangements caused by interstitial telomeric sequences in yeast // PNAS, 2013, V. 110, P. 49, 19866-19871
18. Bardwell L. A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway // Peptides., 2005, V.26., P. 339-350.
19. Bruhn, L., and G. F. Sprague Jr. MCM1 point mutants deficient in expression of alpha-specific genes: residues important for interaction with alpha 1 // Mol. Cell. Biol., 1994 , V. 14, P. 2534–2544.
20. Conde J., Fink G. R. A mutant of *Saccharomyces cerevisiae* defective for nuclear fusion // Proceeding of the National Academy of Sciences USA, 1976, V. 73, № 10, P. 3651-5.
21. de Serres F., Hollaender A. Chemical mutagens. Principles and Methods for their detection, Plenum press, NY and London , 1986, V.6., P. 485.
22. Feldman J.B., Hicks J.B., Broach J.R. Identification of sites required for repression of a silent mating type locus in yeast // J. Mol. Biol, 1984, V. 178, P. 815–834.
23. Haber J. E. Mating-type genes and MAT switching in *Saccharomyces cerevisiae* // Genetics, 2012, V. 191, P. 33–64.

24. Hagen, D. C., L. Bruhn, C. A. Westby, and G. F. Sprague Jr. Transcription of alpha-specific genes in *Saccharomyces cerevisiae*: DNA sequence requirements for activity of the coregulator alpha 1 // *Mol. Cell. Biol.* 1993, V. 13, P. 6866–6875.
25. Herskowitz I. Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*// *Microbiol*, 1989, V.52, P.536-553.
26. Inge-Vechtomov S. G., Pavlov Y. I., Noskov V. N., Repnevskaya M. V., Karpova T. S., Khromov-Borisov N. N., Chekuolene J., Chitavichus D. Tests for genetic activity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Study of forward and reverse mutation, mitotic recombination and illegitimate mating induction // *Progress in mutation research. Evaluation of short-term tests for carcinogens: Report of the International Programme on Chemical Safety's collaborative study on in vitro assays*/Amsterdam, The Netherlands Elsevier, 1985, P. 243-255.
27. Inoue T., Yamaguchi S., Saeki T., Sekiguchi K. Production of infectious swine vesicular disease virus from cloned cDNA in mammalian cells // *J. Gen. Virol*, 1990, V. 71, P. 1835-1842.
28. Kassir Y. Simchen G. Regulation of mating and meiosis in yeast by the mating-type region// *Genetics*, 1976, V.82, P.187-206.
29. Kochenova O.V., Soshkina Y.V., Stepchenkova E.I., Inge-Vechtomov S.G., Sherbakova P.V. Participation of translesion synthesis DNA polymerases in the maintenance of the chromosome integrity in yeast *Saccharomyces cerevisiae*// *Biochemistry(Moscow)*, 2011, V.76, №1, P.49-60.
30. Kostriken, R., J. N. Strathern, A. J. Klar, J. B. Hicks, and F. Heffron A site-specific endonuclease essential for mating-type switching in *Saccharomyces cerevisiae* // *Cell*, 1983, V. 35, P. 167–174.
31. Lemoine F. J., Degtyareva N. P., Lobachev K., Petes T. D. Chromosomal Translocations in Yeast Induced by Low Levels of DNA Polymerase: A Model for Chromosome Fragile Sites // *Cell*, 2005, V. 120, P. 587–598
32. Meeker J.D., Calafat A.M., Hauser R. Urinary bisphenol A concentrations in relation to serum thyroid and reproductive hormone levels in men from an infertility clinic // *Environ Sci Technol*, 2010, V. 44, P. 1458–1463.
33. Meeker J.D., Ehrlich S, Toth T.L., Wright D.L., Calafat A.M., Trisini A.T., Ye X., Hauser R. Semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary bisphenol A among men from an infertility clinic // *Reprod Toxicol*, 2010, V. 30, P. 532–539.
34. Nasheuer H. P. Genome Stability and Human Diseases // *Subcellular Biochemistry*, 2010, Vol. 50.
35. Nasmyth K.A. and Tatchel K. The structure of transposable yeast mating type loci// *Cell*, 1980, V.19, P.753-764.

36. Novoa C.A., Ang J.S., Stirling P.C. The A-like farker assay for measuring yeast chromosome III stability. // *Methods Mol Biol.* 2018; V. 1672: P. 1-9.
37. Oishi S. Effects of butyl paraben on the male reproductive system in mice // *Arch Toxicol*, 2002, V. 76, P. 423–429.
38. Reid R. J., Sunjevaric I., Voth W. P., Ciccone S., Du W., Olsen A. E., Stillman D. J., Rothstein R. Chromosome-scale genetic mapping using a set of 16 conditionally stable *Saccharomyces cerevisiae* chromosomes // *Genetics*, 2008, V. 180, № 4, P. 1799-808.
39. Rose M. D., Winston F., Hieter P. *Methods in yeast genetics*. CSHL Press, 1990, 198 c.
40. Siliciano P.G., Tatchell K. Transcription and regulatory signals at the mating-type locus in yeast // *Cell*, 1984, V. 37, P. 969-978.
41. Soni R, Carmichael JP, Murray JA. Parameters affecting lithium acetate mediated transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and development of a rapid and simplified procedure. // *Curr Genet.* 1993, V 24, P. 455–459.
42. Stepchenkova E.I., Tarakhovskaya E.R., Siebler H.M., Pavlov Y.I. Defect of Fe-S cluster binding by DNA polymerase in yeast suppresses UV-induced mutagenesis, but enhances DNA polymerase-dependent spontaneous mutagenesis // *DNA Repair*, 2017, V. 49. P. 60-69.
43. Strathern J., Hicks J., Herskowitz I. Control of cell type in yeast by the mating type locus. The alpha 1-alpha 2 hypothesis // *J Mol Biol*, V. 147, 1981, № 3, P. 357-72.
44. Zakharov I. A., Yarovoy B. P. Cytofusion as a new tool in studying the cytoplasmic heredity in yeast // *Mol Cell Biochem*, 1977, V. 14, No 1-3, P. 15-8.